° d'enregistrement
u C.N.R.S. : AO 8148

ORSAY
Série A. N°
N° D'ordre : 4085

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de Docteur es-Sciences Naturelles

par

Alain HENAUT

Sujet : La recombinaison mitotique spontanée chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Soutenue le 28 février 1973 devant la Commission d'Examen

Mme M. GANS Président

MM. Ph. VIGIER
J.L. ROSSIGNOL
M. LUZZATI
J.C. MOUNOLOU
Examinateurs

enregistrement
N.R.S. : AO 8148

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de Docteur es-Sciences Naturelles

par

Alain HENAUT

Sujet : La recombinaison mitotique spontanée chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Soutenue le 28 février 1973 devant la Commission d'Examen

Mme M. GANS Président

MM. Ph. VIGIER
J.L. ROSSIGNOL
M. LUZZATI
J.C. MOUNOLOU
Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

La vérité est fille de la discussion,
non pas fille de la sympathie.

Gaston Bachelard.
La philosophie du non.

REMERCIEMENTS.

En tête de cette thèse, je veux remercier M. le professeur Georges Prévost. C'est lui qui m'a engagé à la fin du certificat d'étude supérieure de Génétique et qui m'a appris mon métier. Je lui suis reconnaissant des conseils et du soutien qu'il m'a toujours apportés. C'est aussi lui qui m'a montré l'intérêt des recherches entreprises par M. Mario Luzzati et qui m'a demandé de m'y associer.

Je remercie M. le professeur Piotr Slonimski d'avoir bien voulu m'accueillir au Centre de Génétique Moléculaire du CNRS à Gif-sur-Yvette.

Je remercie Madame le professeur Madeleine Gans de l'intérêt qu'elle a toujours témoigné pour mon travail. Je la remercie, ainsi que Messieurs les professeurs Philippe Vigier et Jean-Luc Rossignol d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie M. Mario Luzzati qui m'a guidé avec patience tout au long de ce travail.

Je suis heureux de remercier ma femme pour l'aide qu'elle m'a apporté

Je remercie enfin le personnel du Centre de Génétique qui m'a toujours montré de la bienveillance.

TABLE DES MATIERES.

	page
INTRODUCTION.	1
CHAPITRE 1. GENETIQUE PHYSIOLOGIQUE DU GENE ade3.	5
1. Effet primaire d'une mutation au locus ade3.	9
2. Métabolisme des unités monocarbonées.	12
3. Causes de l'auxotrophie pour l'adénine et pour l'histidine.	15
4. Conclusions.	18
CHAPITRE 11. GENERALISATION DE L'EFFET HISTIDINE.	21
Introduction.	23
Matériel et méthodes.	23
Résultats expérimentaux et discussion.	26
1. Devenir des auxotrophes durant l'incubation.	29
11. Devenir des prototrophes durant l'incubation.	29
111. Effet de l'histidine sur la recombinaison au locus ade3.	31
1V. Effet de l'histidine sur la recombinaison au locus ura2.	34
Conclusions.	34
CHAPITRE 111. CONTROLE DE L'APTITUDE A RECOMBINER PENDANT LA PHASE VEGETATIVE.	38
Introduction.	40
Matériel et méthodes.	40
Théorie.	42
Résultats.	46
1. Recombinaison intragénique.	46
11. Recombinaison gène centromère.	47
Discussion.	52
CHAPITRE 1V. ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA RECOMBINAISON MITOTIQUE.	56
1. Mode d'action de l'histidine.	58
2. Action du formiate.	60
3. Rôle de l'adénine.	62

4. Détermination de la période sensible à l'action de l'histidine au cours du cycle cellulaire. 68

CHAPITRE V. ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DE LA RECOMBINAISON MITOTIQUE. 72

1. Etude du complexe synaptonématicue. 73

2. Anomalies de la membrane nucléaire. 75

3. Conclusion. 76

CHAPITRE Vl. ANALYSE FORMELLE DE LA RECOMBINAISON MITOTIQUE SPONTANEE. 78

Introduction. 80

Matériel et méthodes. 82

Résultats. 85

1. La recombinaison intergénique. 85

2. La conversion. 86

3. La recombinaison intragénique. 91

4. Recombinaison en phase Gl. 95

5. Résumé. 96

Discussion. 97

Caractéristiques de la recombinaison mitotique spontanée. 97

1. La recombinaison intragénique. 97

2. Mécanismes conduisant à l'homozygotie. 100

Les modèles. 101

1. Implications du phénomène de double conversion. 101

2. Modèles ne faisant pas intervenir d'ADN hybride. 102

3. Modèles faisant intervenir l'ADN hybride. 102

4. Relation expérimentale fréquence de recombinaison distance physique 104

5. Vérification expérimentale du modèle de Fincham et Holliday. 107

Conclusion. 108

CHAPITRE Vll. DISCUSSION GENERALE. 112

RECOMBINAISON ET TRANSCRIPTION. 114

PLURALITE DES MECANISMES DE RECOMBINAISON. 117

SACCHAROMYCES CEREVISIAE. 119

1. Méïose. 119

Méïose complète. 119

Méïose avortée. 119

Méïose résumé. 124

2. Recombinaison mitotique spontanée. 125

Caractéristiques. 125

Recombinaison au stade deux chromatides. 125

Crossing over. 127

Recombinaison mitotique spontanée résumé. 127

3. Recombinaison mitotique induite par les rayons X. 128

Recombinaison intragénique. 128

Différences entre la recombinaison mitotique induite par les rayons X et la recombinaison spontanée. 129

Mécanismes conduisant à l'homozygotie. 133

Recombinaison mitotique induite par les rayons X résumé. 137

4. Recombinaison mitotique induite par les U.V. 137

Recombinaison intragénique. 137

Phase du cycle pendant laquelle se produit la recombinaison. 138

Recombinaison intragénique et "intergénique". 142

Recombinaison mitotique induite par les U.V. résumé. 143

5. Recombinaison mitotique induite par des produits chimiques. 144

6. Pluralité des mécanismes de recombinaison chez Saccharomyces cerevisiae. 146

La recombinaisonintragénique. 146

Conversion dans les croisements "mono" et "bifactoriels". 147

Le problème du crossing over. 148

AUTRES ORGANISMES. 149

1. Ustilago maydis. 149

Recombinaison mitotique induite par les U.V. 149
Relation crossing over conversion. 150
2. Aspergillus nidulans. 151
Phase pendant laquelle se produit la recombinaison. 151
Recombinaison intragénique. 153
Mécanismes conduisant à l'homozygotie. 159
3. Conclusions. 161
CONCLUSION GENERALE. UN MODELE POUR LA RECOMBINAISON MITOTIQUE. 162
1. Recombinaison intragénique. 162
Le modèle. 162
Les vérifications expérimentales. 164
2. Mécanismes produisant l'homozygotie. 165
Crossing over et conversion. 165
Interférence négative entre les conversions. 165
3. Conclusions. 166
L'APPARIEMENT D'ECHANGE. 167
1. Les modèles. 168
Modèle de Stern et Hotta (1969). 168
Modèle de Sobell (1972). 169
Conclusion. 170
2. Induction de l'appariement d'échange. 170
Nature des agents inducteurs. 170
Mutations agissant sur l'appariement d'échange. 171
Mode d'action. 171

INTRODUCTION.

Tout ce que l'on sait sur la recombinaison chez les Eucaryotes a pour origine l'étude de la recombinaison méïotique. Bien qu'elle ait été mise en évidence depuis longtemps (Stern 1936), la recombinaison mitotique n'a en effet joué aucun rôle dans l'élaboration de nos connaissances.

Actuellement, la recombinaison méïotique est si bien décrite que peu de progrès sont à espérer dans cette voie. Par contre, la recombinaison mitotique étant mal connue, son étude devrait être très fructueuse, surtout, pensons-nous, dans les domaines suivants:

-La pluralité des mécanismes de recombinaison chez les Eucaryotes. Si une telle pluralité existe, une analyse limitée à la seule méïose a peu de chances de la mettre en évidence.

-L'appariement d'échange et son contrôle. Ce terme désigne le type d'appariement au cours duquel se produisent les recombinaisons. Il est en effet surprenant que, dans une cellule diploïde, les recombinaisons soient exceptionnelles et qu'elles ne se produisent que dans des conditions physiologiques très particulières. D'un point de vue méthodologique, nous préférons aborder ce problème en provoquant l'appariement d'échange pendant la phase végétative en modifiant la physiologie de la cellule,plutôt qu'en analysant un phénomène très complexe comme la méïose.

Pour notre étude, nous avons exploité les facilités offertes par "l'effet histidine" (Luzzati 1965), qui permet de provoquer, dans des conditions physiologiques bien définies, la recombinaison mitotique.

Notre travail a tout d'abord consisté à mieux définir cet "effet histidine", tant d'un point de vue biochimique (chapitre I) que d'un point de vue génétique (chapitres II et III). Ensuite, nous avons pu étudier le contrôle physiologique de l'appariement d'échange (chapitre IV) et décrire de façon suffisament précise la recombinaison mitotique spontanée (chapitre VI). Nous avons aussi tenté de dégager certains aspects ultrastructuraux de la recombinaison mitotique (chapitre V).

De ces trois orientations, celle qui a été la plus féconde est sans doute l'analyse formelle de la recombinaison mitotique. Nous avons pu montrer

qu'il y a des différences à un niveau moléculaire entre recombinaison mito
tique et recombinaison méïotique. Mais le plus surprenant, peut-être, est
que l'on arrive à un modèle plus satisfaisant pour la recombinaison in-
tragénique mitotique que pour la recombinaison intragénique méïotique
(chapitre VII).

Stern C. Somatic crossing over and segregation in Drosophila melanogaster Genetics 21 625-730 (1936).

Luzzati M. Thèse. Paris (1965).

CHAPITRE 1.

GENETIQUE PHYSIOLOGIQUE DU GENE ade3.

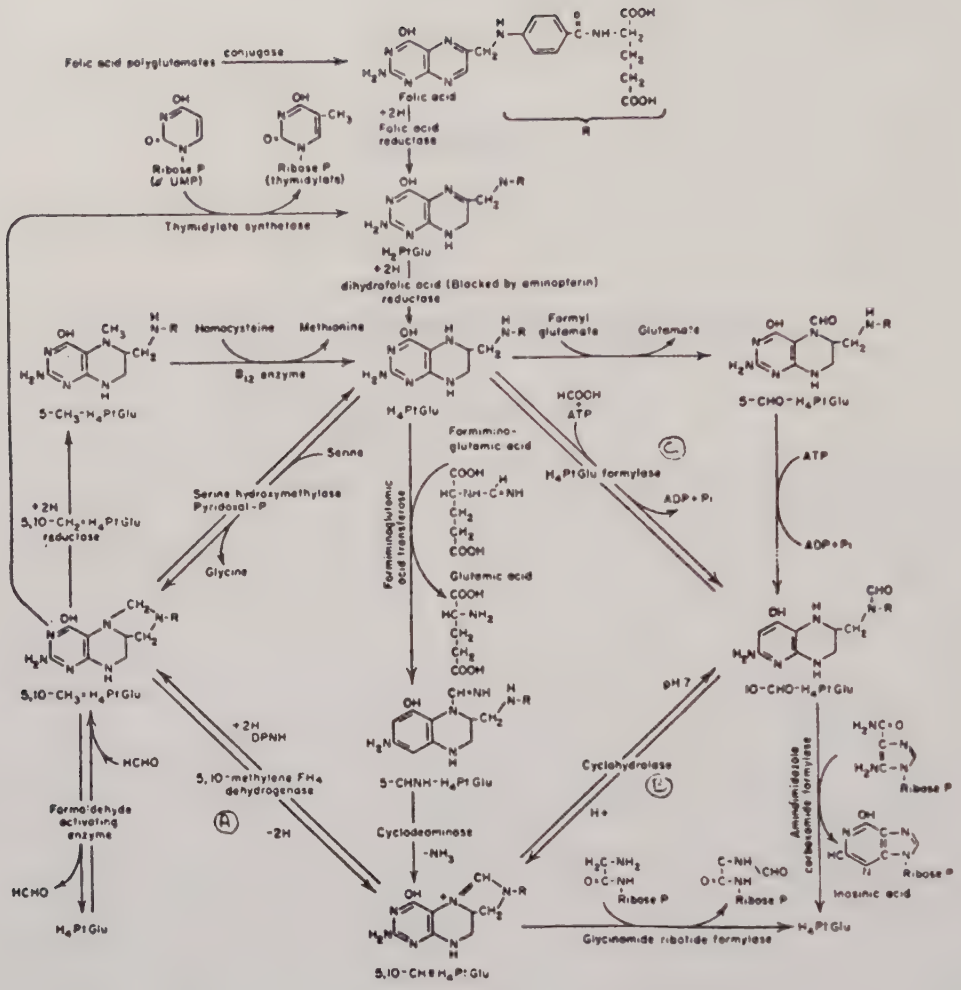


Figure 1.

Métabolisme des unités monocarbonées d'après Stokstad E.L.R. et Koch J. (1967).

TABLEAU 1

Mutants	Auxotrophie		Phénotype du double mutant ade2 adex	N^{10} formyl THF synthetase	N^5 N^{10} méthènyl THF cyclohydrolase	N^5N^{10} méthylène THF déshydrogénase (a)	Référence	Remarques
	adénine	histidine						
+	+	+	rouge	100	100	100	1	
ade3.3	-	-	blanc	6,5	15	30	1	faux sens
ade3.10	-	-	blanc	11,5	13	35	1	délétion
ADE 15	-	+	blanc	13	200	130	2	mutant très lié
A4	-	+	rose	36	0 (b)	9	3	allèles de ade3
A 199	-	+	rose	110	0 (b)	6	3	
ade3.08	-	-	blanc	10	11	31		
ade3.08S08	-	+	?	10	11	50		suppresseur très lié

(a) L'activité résiduelle de la N^5 N^{10} méthylène THF déshydrogénase (inférieure à 40% du sauvage) correspond à l'activité de la deuxième forme de cette enzyme (Lazowska etLuzzati 1970 b).

(b) Dans les expériences de Lomax et al, la détermination de l'activité cyclohydrolase est mauvaise. Le niveau enzymatique ne doit pas être différent de celui d'ade3.3.

1.-Lazowska et Luzzati (1970 a).

2.-Jones et Keng-Bon Lam (communication personnelle).

3.-Lomax, Gross et Woods (1971).

Le problème posé par le gène ade3 est très complexe. Il faut à la fois expliquer la déficience multienzymatique que provoque une mutation ponctuelle au locus ade3 et les rapports qui existent entre cette déficience et l'auxotrophie pour l'adénine et l'histidine.

L'importance croissante qu'a pris l'étude de la recombinaison mitotique dans notre travail nous a obligé à abandonner très tôt nos recherches sur la génétique physiologique du gène ade3.

Une mise au point sur ce problème est faite dans ce chapitre.

1. Effet primaire d'une mutation au locus ade3.

Les faits.

La figure 1 résume les possibilités théoriques d'interconversion des coenzymes foliques. Chez Saccharomyces cerevisiae, il existe un certain nombre de mutations qui affectent les enzymes mises en jeu dans ces interconversions. Les propriétés des principaux mutants étudiés jusqu'ici figurent dans le tableau 1. Il faut remarquer que d'une façon générale, on ne détermine que l'activité de trois des enzymes intervenant dans le métabolisme des unités monocarbonées.

Les mutations au locus ade3 se caractérisent, à une exception près, par la perte totale d'une des formes de la N^5 N^{10} méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (EC 1.5.1.5) (Lazowska et Luzzati 1970 b). La seule exception est celle de la souche ade3.08 S08. Le suppresseur S08 rend le mutant ade3.08 prototrophe pour l'histidine. Ce suppresseur est très lié à ade3.08 (2 tétrades tétratypes sur 45 tétrades. Hénaut, résultats non publiés). Certaines des mutations localisées au niveau du gène ade3 (ade3(his$^+$) Lomax, Gross et Woods 1971) ont une activité N^{10} formyltétrahydrofolate synthétase (EC 6.3.4.3.) identique à celle de la souche sauvage. Dans le cas de ADE 15, mutant dominant très lié à ade3 (3% de tétrades tetratypes dans le croisement ADE 15 x ade3.41) , seule

la N^{10} formyltétrahydrofolate synthétase a une activité inférieure à celle du sauvage. Il est remarquable que le double mutant ADE 15.ade3.41 a des niveaux enzymatiques égaux à ceux de ade3.41 et qu'il est récessif.

Interprétation.

Deux types de modèles peuvent être retenus.

Opéron. Pour rendre compte de cet ensemble de résultats, Jones (1972 b) a proposé une hypothèse du type opéron. Elle part du fait que 70% des mutations sélectionnées au locus ade3 sont du type non sens, (61% ochre et 9% ambre) et que tous les mutants ont totalement perdus la forme 1 de la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase. Elle suppose alors que ade3 est le gène de structure de la déshydrogénase 1 et qu'il occupe une position proximale dans l'opéron responsable de la synthèse des enzymes d'interconversion des coenzymes foliques. La formyltétrahydrofolate synthétase et la méthènyltétrahydrofolate cyclohydrolase subissent une réduction coordonnée de leurs niveaux d'expression en présence d'une mutation polaire dans le gène ade3.

Cette hypothèse rend très difficilement compte du phénotype des mutations faux sens du type ade3.3 et des mutants du type A4 ou A 199 de Lomax et al (1971).

Agrégat. Nous proposons une hypothèse alternative, basée sur un agrégat multienzymatique. Cette hypothèse a aussi été avancée, sans autre détail, par Lomax et al (1971) et Jones (1972 a).

Nous supposons que le gène ade3 code pour la déshydrogénase 1 et que l'agrégat enzymatique n'est fonctionnel que si chacune des protéines qui le constituent a une configuration satisfaisante. En l'absence d'agrégat, chaque protéine n'a qu'une activité enzymatique résiduelle ou nulle. La plupart des mutations sélectionnées au locus ade3 font que le gène ne code plus pour une protéine (77% des mutants sont des non sens ou des délétions) ce qui empêche la formation de l'agrégat. Les mutants faux sens (type ade3.3) doivent donner une configuration telle à la

protéine qu'elle ne peut plus entrer dans le complexe. Théoriquement, il doit exister des mutations au locus ade3 qui entraînent la perte de l'activité déshydrogénase tout en permettant la formation d'un agrégat fonctionnel. Ce type de mutant n'a jamais été isolé, peut-être parce qu'une cellule possèdant toutes les possibilités d'interconversion des unités monocarbonées, à l'exception de la déshydrogénase 1, n'aurait pas un phénotype décelable. Les mutants du type A4, A 199 représenteraient un cas particulier où la protéine codée par le gène ade3 stabilise suffisament la formyltétrahydrofolate synthétase pour que celle-ci ait la même activité que dans la souche sauvage, sans pour cela rendre la méthènyltétrahydrofolate cyclohydrolase active. La souche ade3.08 S08 illustre, dans cette hypothèse, le cas où la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase a une certaine activité enzymatique, mais où la protéine est incapable de stabiliser l'agrégat. Enfin, ADE 15 doit être un allèle d'ade3. Cette mutation donne une configuration telle à la déshydrogénase que celle-ci empêche la fixation de la synthétase dans le complexe. Le double mutant ADE 15 ade3.41 ne conduit pas à une protéine plus efficace que le simple mutant ade3.41. Il a donc toutes les propriétés de ade3.41.

Dans toute cette discussion, nous n'avons tenu compte que de trois des enzymes d'interconversion, les seuls pour lesquels nous ayons des données expérimentales. Rien n'exclut la possibilité que d'autres enzymes fassent partie de cet agrégat.

Notre modèle présente l'avantage d'expliquer pourquoi des mutations non sens au locus ade3 ont le phénotype sauvage restauré dans certaines conditions de pression osmotique ou de température (Jones 1972 a). Il permet de faire les prédictions suivantes: 1) La plupart des mutants du type A4,A 199 doivent être dûs à des mutations faux sens. 2) Il doit être possible de sélectionner des suppresseurs extragéniques d'ade3 qui restaurent les activités formyltétrahydrofolate synthétase et méthènyltétrahydrofolate cyclohydrolase. Sur un plan biochimique, il est peut-être possible de séparer cet agrégat multienzymatique. L'étude des modifications des propriétés physicochimiques de ces enzymes dans des souches

contenant un mutant ade3 non sens et un suppresseur de non sens doit permettre de démontrer que ade3 est bien le gène de structure de la forme 1 de la déshydrogénase.

2. Métabolisme des unités monocarbonées.

Un modèle du type agrégat prédit l'existence de suppresseurs extragéniques du gène ade3. La sélection de telles mutations est basée sur les idées que l'on peut se faire des niveaux intracellulaires des divers coenzymes foliques.

Pool intracellulaire.

N^5 N^{10} méthylènetétrahydrofolate. Les souches ade3 accumulent du N^5 N^{10} méthylènetétrahydrofolate (Luzzati 1971). Le niveau intracellulaire de ce coenzyme est dix fois plus élevé dans une souche ade3.10 (délétion au locus ade3) que dans la souche sauvage de référence, au cours de la croissance exponentielle. Il doit être synthétisé par l'intermédiaire de la sérine hydroxyméthyltransférase (EC 2.1.2.1.).

On ne connaît malheureusement pas de mutation affectant cette activité enzymatique. En effet, les travaux anciens de Pigg, Spence et Parks (1962) n'ont pas été confirmés (Parks. Communication personnelle).

N^5 N^{10} méthènyltétrahydrofolate . Ce coenzyme est utilisé au cours d'une étape précoce de la chaîne de l'adénine (réaction Glycinamide ribonucléotide → α. N formylglycinamide ribonucléotide). Sa concentra-

tion in vivo peut donc être estimée en mesurant le flux de la chaîne de l'adénine. Chez Saccharomyces cerevisiae cette mesure est facilitée par l'existence d'une mutation (ade2) qui bloque le fonctionnement d'une étape tardive de la chaîne de l'adénine, ce qui provoque l'accumulation d'un pigment rouge. Si une mutation ade x. agit à un niveau précoce de la chaîne de l'adénine, le double mutant ade2 ade x aura un phénotype blanc (Roman 1956). Le double mutant ade2 ade3 étant blanc, il est logique de supposer que le niveau intracellulaire de N^5 N^{10} méthènyltétrahydrofolate est trop faible dans ces souches pour permettre un fonctionnement normal de la chaîne de l'adénine.

N^{10} formyltétrahydrofolate. Ce produit est le coenzyme de la réaction de formylation de l'AICAR (5 amino-4 imidazole carboxamide ribotide) Son niveau intracellulaire doit être très bas, puisque les souches ade3 accumulent des quantités importantes d'AICAR (Levinthal, Fogel et Hurst 1962, Mazlen et Eaton 1967). On peut supposer que dans les souches A4 ou A 199, où la formyltétrahydrofolate synthétase est active, tout le N^{10} formyltétrahydrofolate est transformé en N^5 N^{10} methényltétrahydrofolate à la suite d'une réaction d'équilibre spontanée, ce qui expliquerait que ces souches accumulent de l'AICAR et que le double mutant ade2 A4 ou ade2 A 199 soit rose.

Mutations conduisant à un haut niveau de N^5 N^{10} méthènyltétrahydrofolate
Des mutations de ce type restaureraient la pigmentation dans un double mutant ade2 ade3, ce qui rend leur sélection facile. Elles peuvent agir soit en rétablissant l'activité formyltétrahydrofolate synthétase (suppresseurs extragéniques), soit en rétablissant l'activité méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (suppresseurs intragéniques dans notre hypothèse).

En partant d'un haploïde ade2 ade3.3 (ade3.3 est une mutation faux sens) nous avons sélectionnés deux types de suppresseurs donnant une pigmentation rouge à la souche (tableau 2). Certains ne corrigent pas l'auxotro

TABLEAU 2.

Mutant	Auxotrophie		Dominance des suppresseurs	N^{10} formyl THF synthétase	N^5N^{10} méthènyl THF cyclohydrolase	N^5N^{10} méthylène THF déshydrogénase	Liaison S.ade3 (a)	Remarques
	adénine	histidine						
+	+	+		100	100	100		
ade3	−	−		11	13	35		
ade3.3R12	−	−	Récessif	11	5	26	6 : 6 / 10	ade2 ade3R est
ade3.3R17	−	+	Récessif	7,5	10	29	6 : 7 / 31	rouge
ade3.10 R3 / ade3.10 +	+	+	Dominant	7	10	17	3 : 14 / 24 (b)	Spontané MA 26 R 3

(a) Les résultats sont donnés de la façon suivante:

$$\frac{\text{Tétrade ditype parental : Tétrade ditype recombiné}}{\text{Tétrade tétratype}}$$

(b) Cette ségrégation indique que le système de suppression R 3 est polygénique.

phie pour l'histidine (R 12), d'autres si (R 17), mais tous sont indépendants du gène ade3, et récessifs. Aucun de ces suppresseurs ne modifie les activités déshydrogénase, cyclohydrolase ou synthétase de l'haploïde ade2 ade3 d'origine.

L'échec de cette méthode de sélection pouvant recevoir différentes interprétations nous avons cherché des suppresseurs rétablissant totalement le phénotype sauvage.

Mutations corrigeant l'exigence en adénine et en histidine.

Nous sommes partis d'un diploïde homozygote pour le mutant ade3.10 (délétion) afin d'être sûrs de sélectionner des suppresseurs extragéniques dominants. Nous avons analysé un des révertants (MA 26 R3). Le phénotype sauvage est presque totalement restitué (temps de division en milieu minimum 11h, en milieu supplémenté en adénine et en histidine 3h30) par un système de suppression probablement polygénique sans que soient rétablies les activités enzymatiques déficientes chez ade3 (tableau 2).

Conclusion.

Aucune des mutations sélectionnées ne modifie le niveau des enzymes d'interconversion des unités monocarbonées dans une souche ade3. Nous ne pouvons donc ni infirmer, ni confirmer notre hypothèse d'agrégat multienzymatique. Le fait que certains de ces mutants restituent presque totalement le phénotype sauvage (MA 26 R 3) montre que le métabolisme des coenzymes foliques doit être très complexe.

3. Causes de l'auxotrophie pour l'adénine et pour l'histidine.

Si il est possible de se faire une idée de la lésion primaire provoquée par une mutation au locus ade3, il est beaucoup plus difficile de prévoir l'influence que cela a sur le métabolisme des unités monocarbonées, ce qui fait qu'il n'existe pas actuellement d'interprétation entièrement satisfaisante de l'auxotrophie pour l'adénine et l'histidine des souches

ade3.

Besoin en histidine.

Il semble que l'auxotrophie pour l'histidine soit due à l'action inhibitrice de la N^5 N^{10} méthylènetétrahydrofolate sur l'enzyme (BBM 11 isomérase EC 5.3.1.16) qui assure l'étape N-(5'-phosphoribosylformimino)-5 amino-1-(5"-phosphoribosyl)-4-imidazolecarboxamide (BBM 11) → N-(5'-phosphoribulosylformimino)-5 amino-1-(5"-phosphoribosyl)-4-imidazolecarboxamide (BBM 111), alors que le N^5 N^{10} méthènyltétrahydrofolate stimulerait cette enzyme (Jones 1968).

Il existe des suppresseurs du besoin en histidine (Zimmerman et Schwaier 1963, "mérosuppresseurs" Luzzati 1965). Un de ces mutants, S9, qui empêche l'accumulation d'AICAR (Mazlen 1968) agirait plus par un effet d'épargne des coenzymes foliques que par l'intermédiaire d'une action inhibitrice de l'AICAR même.

Besoin en adénine.

L'AICAR ne doit pas non plus inhiber une étape précoce de la chaîne de l'adénine, comme le suppose Mazlen (1968). En effet, les mutants du type A4, A 199 accumulent de l'AICAR à un taux identique à celui des souches ade3 standard, et pourtant un haploïde ade2 A4 ou ade2 A 199 a un phénotype rose (Lomax et al 1971). D'autre part, nous avons construit une souche ade2 ade3.3 S9 , dans laquelle il ne doit pas y avoir d'accumulation d'AICAR, à cause du gène S9 (Mazlen 1968). Si le bloc précoce de la chaîne de l'adénine était dû à l'AICAR, une telle souche devrait être rouge, or elle a le phénotype blanc. L'AICAR ne semble donc jouer aucun rôle dans le besoin en adénine.

Le besoin en adénine peut s'expliquer par un niveau insuffisant de N^5 N^{10} méthènyltétrahydrofolate et de N^{10} formyltétrahydrofolate. Dans cette hypothèse, les difficultés que présente l'interprétation du phénotype des mutants de Lomax et al (1971) de MA 26 R 3 ou de ADE 15 sont reportées sur la compréhension du métabolisme des unités monocarbonées.

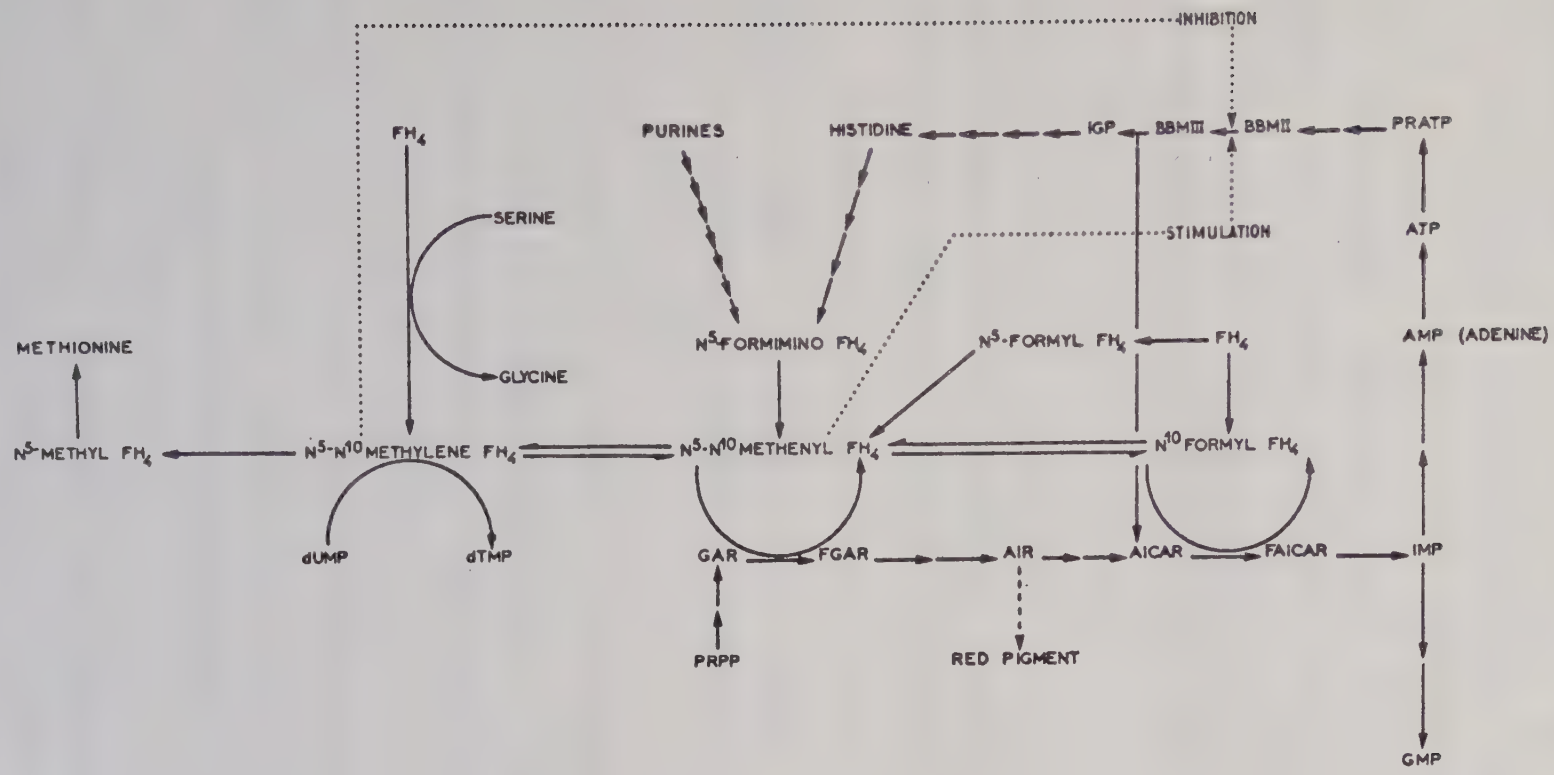


Figure 2.

Interactions connues entre les chaînes de biosynthèse de l'adénine, de l'histidine et des coenzymes foliques.

4. Conclusion.

Les mutants ade3 provoquent une auxotrophie pour l'adénine et l'histidine et plusieurs déficiences enzymatiques au niveau des interconversions des coenzymes foliques. La complexité des rapports entre ces chaînes de biosynthèse est suggérée par la figure 2.

Devant l'état rudimentaire de nos connaissances sur la régulation, à coup sûr très complexe, de cet ensemble de chaînes de biosynthèse, il nous semble très prématuré de chercher à la suite de quelle action au niveau du métabolisme intermédiaire l'histidine a une influence sur la recombinaison mitotique.

Remerciements. Nous remercions E.W. Jones et Keng-Bon Lam pour nous avoir autorisés à utiliser certains de leurs résultats non publiés.

BIBLIOGRAPHIE.

Jones E.W. Fine structure analysis of the ade3 locus in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 70 233-250 (1972 a).

Jones E.W. Nonsense mutations in the ade3 locus of Saccharomyces cerevisiae. Genetics 71 217-232 (1972 b).

Jones E.W. et Magasanik B. Block in the interconversions of folic acid coenzymes. Bacteriol. Proc. page 127 (1967).

Lazowska J. et Luzzati M. Biochemical deficiency associated with ade3 mutations in Saccharomyces cerevisiae. 1. Levels of three enzymes of tetrahydrofolate metabolism. Biochem. Biophys. Res. Comm. 39 34-39 (1970 a).

Lazowska J. et Luzzati M. Biochemical deficiency associated with ade3 mutations in Saccharomyces cerevisiae. 11. Separation of two forms of methylenetetrahydrofolate deshydrogenase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 39 40-45 (1970 b).

Levinthal M., Fogel S., et Hurst D.D. Genetic and biochemical analysis of purines biosynthetic pathways in Saccharomyces. Genetics 47 967 (1967).

Lomax C.A., Gross T.S. et Woods R.A. New mutant types at the ade3 locus of Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 107 1-7 (1971).

Luzzati M. Méro-suppresseurs du locus ade3 chez Saccharomyces cerevisiae. Ann. Gen. 8 114 (1965).

Mazlen A.S. Ph. D. Thesis. The City University of New York (1968).

Mazlen A.S. et Eaton N.R. Biochemical basis for the adenine requirement of ade3 mutant of Saccharomyces. Biochem. Biophys. Res. Comm. 26 590-595 (1967).

Pigg C.J., Spence K.D. et Parks L.W. Methionine biosynthesis in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 97 491-496 (1962).

Roman H. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast. Compt. Rend. Lab. Carlsberg. Sér. Physiol. 26 299-314 (1956).

Stokstad E.L.R. et Koch J. Folic acid metabolism. Physiological Rev.47 83-116 (1967).

Zimmerman F.K. et Schwaier R. Teilweise Reversion einer Histidin - Adeninbedürftigen Einfachmutante bei Saccharomyces cerevisiae Z. Vererb.-Lehre 94 253-260 (1963).

CHAPITRE II.

GENERALISATION DE"L'EFFET HISTIDINE"

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication.

Hénaut A. et Luzzati M.
Contrôle biochimique de la recombinaison chez Saccharomyces cerevisiae: II. Inhibition par la L.histidine de la recombinaison intragénique à deux loci non liés.

Molec. Gen. Genetics 111 138-144 (1971).

INTRODUCTION.

Découverte en 1959 (Luzzati, Clavilier et Slonimski, 1959) l'inhibition par la L.histidine de la réversion vers la prototrophie pour le locus ade3 (gène dont la mutation entraîne une auxotrophie pour l'adénine et l'histidine) fit l'objet d'une étude plus poussée qui montra que c'est la recombinaison intragénique mitotique qui est inhibée à 90% à ce locus par la L.histidine, les autres acides aminés étant sans action (Luzzati, Clavilier et Péré, 1963). Ce fait fut interprété comme une action du répresseur, formé en présence de la L.histidine, au niveau de la transcription et de la recombinaison (Luzzati, 1965; Whitehouse 1966)

Cette relation entre recombinaison et transcription fut étudiée chez les bactéries. Chez ces organismes, elle est nulle (Shestakov et Barbour 1967) ou très faible (Helling 1967, Herman 1968).

Chez les champignons, on connait des gènes qui contrôlent la recombinaison au niveau de certains loci (Catcheside 1968, Catcheside et Austin 1969, Stamberg 1969). Dans ce cas, où l'action de ces gènes sur la transcription fut testée, il n'est apparu aucune corrélation (Catcheside 1968)

Abordant ce problème sous un angle génétique, nous sommes partis de l'hypothèse que si l'histidine agit comme corépresseur, son action ne doit être sensible que dans un court segment englobant ade3. La fréquence de recombinaison entre des allèles d'un gène extérieur doit être constante. Dans le cas contraire, il faudra chercher l'explication de ce phénomène dans une action directe du bloc biochimique entraîné par la mutation du gène ade3, sur la recombinaison. Dans ce chapitre, nous décrierons les expériences faites avec le gène ura2, indépendant d'ade3.

MATERIEL ET METHODES.

Souches (tableau de souches)

Les mutants ade3.3 et ade3.6 proviennent des souches de Roman. Les

TABLEAU DES SOUCHES

Nom du diploide	Nom des parents	Génotype
MA 122	MA 22-2B x MA 111-13B	a ad3-3 ur2-18 x α ad3-6 ur 2-30
MA 129	MA 20-8C x MA 111-13B	a ad3-3 ur2-18 x α ad3-6 ur 2-30
MA 150	MA 138-5C x MA 110-11A	a ad3-6 ur2-30 x α ad3-6 ur2-18

mutants ura2.18 et ura2.30 nous furent donnés par Lacroute.

On appelle "ρ^+" les cellules du type "grande colonie" et "ρ^-" les cellules du type "petite colonie", issues des précédentes par action de l'acriflavine.

Milieux.

Les milieux ont été décrits précédemment (Luzzati, Clavilier, Péré-Aubert et Slonimski 1971). Le milieu minimal peut être supplémenté en adénine (concentration finale 20 μg/ml) en uracile (20 μg/ml) et en L.histidine (10 μg/ml). Le milieu différentiel, qui permet de distinguer les ρ^+ des ρ^- contient 2% de glycérol et 0,1% de glucose.

Techniques génétiques.

L'analyse des tétrades est conduite selon la technique classique (Johnston et Mortimer 1959). La détermination du génotype des spores est faite par l'analyse des besoins nutritionnels et le test de complémentation.

Technique spéciale pour l'étude de la recombinaison.

L'effet d'une carence en histidine sur la recombinaison au locus ura2 dans une souche double hétéroallèlique ade3 ura2 (auxotrophe pour l'adénine, l'histidine et l'uracile) serait très difficile à mettre en évidence avec les techniques classiques d'étude de la recombinaison. En effet, il faudrait sélectionner des cellules auxotrophes pour l'adénine et l'histidine et prototrophes pour l'uracile, sur un milieu ne contenant pas d'histidine. Cette difficulté est tournée par l'emploi d'une incubation en liquide au moment de la recombinaison, le dénombrement des recombinants prototrophes se faisant ensuite de façon classique, sur boîte (Luzzati 1965, Luzzati et al 1971).

Cet effet de la carence étant irréversible au bout de 20 heures à 28°C (Clavilier, Luzzati et Slonimski 1960) les cellules peuvent alors

être étalées après une dilution convenable (de l'ordre de 2.10^5 cellules par boîte) sur un milieu différentiel contenant de l'histidine et de l'adénine pour compter les prototrophes pour l'uracile ($ura2^+$), de l'histidine et de l'uracile pour les $ade3^+$. Les auxotrophes sont comptés sur du lilieu synthétique différentiel supplémenté pour les trois facteurs de croissance. Pendant l'incubation en liquide, l'acriflavine transforme les bourgeons en ρ^-, les cellules mères restant ρ^+. Grâce à cette technique, sur le milieu différentiel, on peut distinguer les cellules présentes au début de l'incubation, qui restent ρ^+, de leur descendance ρ^-.

Le mélange d'incubation est composé de milieu synthétique minimal, avec 2% de glucose, tamponné à pH 6,1 avec du tampon phosphate 0,1 M, additionné d'acriflavine à une concentration finale de $5\ 10^{-6}$ M et de traces d'adénine (0,5 μg/ml). On l'ensemence avec des cellules provenant d'une culture en phase exponentielle pour obtenir une concentration finale de 10^6 cellules par ml. Cette suspension est divisée en deux, une des parties aliquotes est supplémentée en histidine (10 μg/ml) et notée HA, l'autre non (OA).

On fait des étalements pour dénombrer les différentes catégories de cellules au début (témoin) et à la fin de l'incubation.

RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION.

L'incubation de 20 heures en milieu liquide est la seule différence entre les conditions OA (absence d'histidine) et HA (présence d'histidine), puisqu'ensuite tout est étalé sur les mêmes milieux. Les variations observées, tant pour les auxotrophes que pour les prototrophes, dans une expérience sont donc entièrement déterminées durant l'incubation.

TABLEAU 1.

Expérience	Souche	Temps 0'	Temps 20 heures				% survie		% ρ^+	
		ρ^+	ρ^+		$\rho^+ + \rho^-$					
			OA	HA	OA	HA	OA	HA	OA	HA
H 832	MA129	7	2,6	6,1	3,6	7,2	52	103	72	85
H 835	MA122	7,2	4,1	5,4	4,5	7,2	63	100	91	75
H 836	MA129	5,6	1,9	3,8	2,8	5,4	50	97	91	85
H 814	MA150	6,1	5,2	4,7	5,7	5,5	94	90	68	70

Devenir des auxotrophes durant l'incubation.

1. Nombre de cellules auxotrophes par ml x 10^{-5}.

TABLEAU 2.

Expérience	Souche	Prototrophes ad3 [2]			Prototrophes ur2 [2]		
		Temps 0. p^+	Temps 20 heures. p^-		Temps 0. p^+	Temps 20 heures. p^-	
			OA	HA		OA	HA
H 832	MA129	53	91	88	22	27	198
H 835	MA122	8	110	99	17	156	246
H 836	MA129	49	75	66	39	59	428
H 814	MA150	-	-	-	12	100	92

Devenir des prototrophes préexistants durant l'incubation.

2. Nombre de cellules prototrophes par ml.

1. Devenir des auxotrophes durant l'incubation (tableau 1).

Le nombre total d'auxotrophes est constant en présence d'histidine. En absence d'histidine, la survie des cellules varie selon les souches, sans que cela influe sur la recombinaison (Exp: H 832 et H 814, tableau 1).

L'acriflavine, qui est connue pour transformer en ρ^- les bourgeons cellulaires en formation (Ephrussi et Hottinguer 1951) a aussi une action mutagène faible sur les cellules mères (cf Luzzati et al 1971). Ceci explique la diminution des auxotrophes ρ^+ durant l'incubation. Cette diminution est indépendante de l'histidine et de l'ordre de 20%.

11. Devenir des prototrophes durant l'incubation (tableau 2).

Les cellules prototrophes pour l'adénine et l'histidine ($ade3^+$) ou pour l'uracile ($ura2^+$) préexistantes à l'incubation seront ρ^+. Leur descendance sera transformée pendant l'incubation, par l'acriflavine, en ρ^-. L'étude de ces dernières donne une estimation du nombre de divisions survenues durant les 20 heures.

Les $ade3^+$ $ura2^-$ se multiplient de la même façon en présence ou en absence d'histidine. Les $ade3^-ura2^+$ se divisent plus dans les conditions HA car elles utilisent les traces d'adénine présentes dans le milieu et l'histidine. De la même façon que les cellules filles des prototrophes antérieures à l'incubation sont transformées en ρ^- la descendance des prototrophes nouvellement formées peut être distinguée des cellules où se produit la recombinaison. En effet, seules ces dernières resteront ρ^+.

L'étude de ces deux points permet d'affirmer que l'histidine n'entraîne pas une mortalité différente suivant les conditions d'incubation. Elle n'inhibe pas non plus la croissance des cellules prototrophes.

TABLEAU 3.

Expérience	Souche	Accroissement brut			Accroissement réduit			%
		Témoin	OA	HA	Témoin	OA	HA	inhibition
H 832	MA129	25	442	106	0	417	81	81
H 835	MA122	10	386	75	0	376	65	83
H 836	MA129	74	623	74	0	549	0	100

Acroissement des prototrophes pour l'adénine et l'histidine (ρ^+ ade3$^+$). L'acroissement est calculé entre le début de l'incubation et 44 heures. Il est exprimé par rapport à 10^6 cellules auxotrophes. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule:

$$\frac{\text{Acroissement réduit OA} - \text{Acroissement réduit HA}}{\text{Acroissement réduit OA}} \times 100$$

111. Effet de l'histidine sur la recombinaison au locus ade3 (tableau 3 et figure 1).

Pour éliminer les fluctuations du taux des prototrophes ρ^+ préexistants on considère l'accroissement au cours du temps du nombre de recombinés. La cinétique d'apparition des prototrophes ρ^+(fig.1) montre que leur nombre s'accroît pendant les 44 heures qui suivent le début de l'incubation. Ensuite la fréquence d'apparition est faible et indépendante des conditions antérieures. Elle est égale à celle de la partie aliquote étalée dès le début de l'incubation (témoin).

L'accroissement entre la vingtième et la quarante quarantrième heure peut être dû, soit à un délai d'expression phénotypique des recombinants apparus au cours de l'incubation en liquide, soit à des recombinaisons induites avant la vingtième heure et ne s'effectuant que lentement. De toute façon le mécanisme qui entraîne l'apparition des prototrophes ρ^+ est alors à un stade où il est insensible à l'action de l'histidine, puisque cette apparition se produit sur boîte en présence d'histidine. Actuellement, rien ne permet de trancher entre les deux hypothèses.

Pour mettre en évidence le rôle propre de l'incubation en liquide sur l'accroissement dans les conditions OA et HA, ce dernier doit être diminué de l'accroissement résiduel qui se produit sur boîte, donné par le témoin. On obtient ainsi "l'accroissement réduit".

Cette rectification faite, on voit que l'accroissement des prototrophes ρ^+ dans la partie aliquote incubée en présence d'histidine est faible ou nul. Il est très important s'il y a carence en histidine durant les 20 heures d'incubation.

Dans ces souches, la recombinaison au locus ade3 présente donc les mêmes caractéristiques que dans le diploïde LM 27 dont l'étude permit d'affirmer que l'histidine agit au niveau de la recombinaison elle-même. (Luzzati 1965; Luzzati et al 1971).

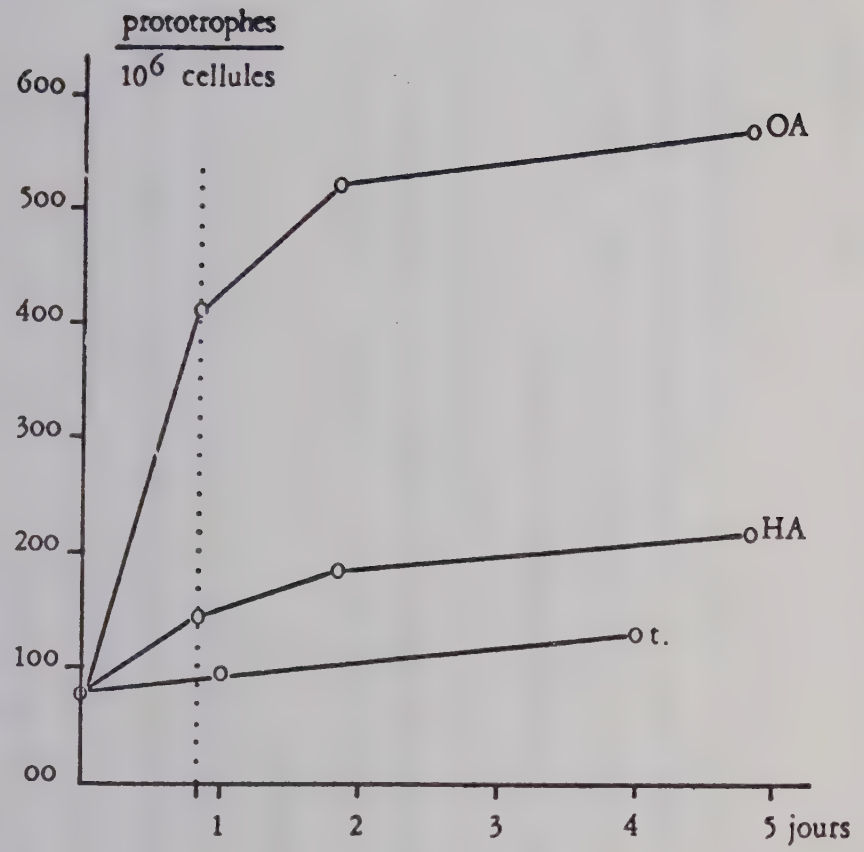


Fig. 1.

Recombinaison au locus ade3 dans le diploïde MA 129 (Expérience H 832).

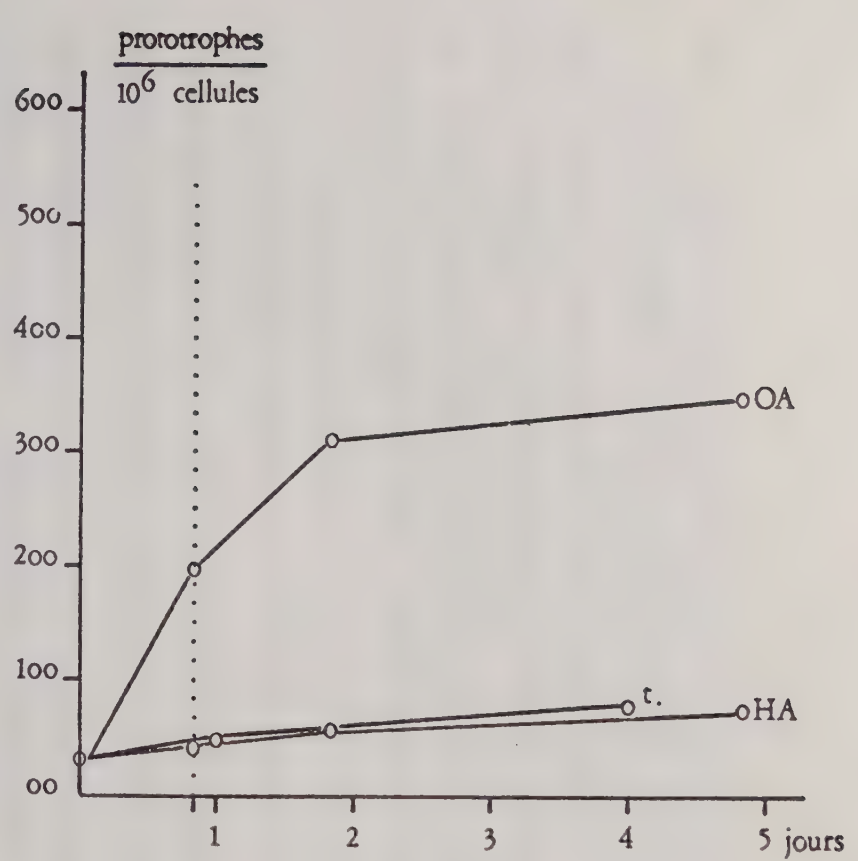


Fig. 2.

Recombinaison au locus ura2 dans le diploïde MA 129 (Expérience H 832).

Abscisse: temps en jours; ordonnée: nombre de cellules prototrophes pour 10^6 cellules . La ligne pointillée parallèle à l'ordonnée indique la fin de la phase liquide. OA carence en histidine pendant l'incubation liquide. HA incubation en liquide en présence de 10 g/ml de L.histidine. t témoin, partie aliquote étalée dès le début de la phase liquide.

TABLEAU 4.

Expérience	Souche	Accroissement brut			Accroissement réduit			%
		Témoin	OA	HA	Témoin	OA	HA	inhibition
H 832	MA129	24	279	24	0	255	0	100
H 835	MA122	32	837	173	0	805	141	82
H 836	MA129	80	335	58	0	255	0	100
H 814	MA150	20	376	118	0	356	98	73

Acroissement des prototrophes pour l'uracile (ρ^+ ura2$^+$).

Même légende que pour le tableau 3.

IV. Effet de l'histidine sur la recombinaison au locus ura2. (tableau 4 et figure 2).

Dans les diploïdes utilisés pour ces expériences, le gène ura2 semble faiblement lié au gène ade3 (tétrades ditypes parentales 17, ditypes recombinées 5, tétratypes 55). Ceci n'est pas le cas général; le plus souvent ura2 est génétiquement indépendant d'ade3 (cf chapitre VI). De toute façon, le locus ura2 n'est pas adjacent au locus ade3.

La recombinaison au locus ura2 présente les mêmes caractères que celle au niveau d'ade3. Elle est sensible à l'action de l'histidine. Dans l'expérience H 832, l'accroissement brut passe de 24 en présence d'histidine à 279 en son absence. L'inhibition de la recombinaison est du même ordre de grandeur aux deux loci. En effet, la valeur moyenne de l'inhibition dans les expériences décrites dans ce chapitre est de 88% pour ade3 et 89% pour ura2. Devant cette similitude totale, il est légitime de penser que la L.histidine agit de la même façon sur la recombinaison aux deux loci.

D'autre part, dans un diploïde hétérozygote pour le locus ade3, la L.histidine n'inhibe pas la recombinaison au locus ura2. Le niveau de celle-ci est indépendant des conditions d'incubation et reste faible. L'accroissement brut est de 25, aussi bien dans les conditions OA et HA que dans le témoin, ce qui est très semblable au résultat de l'expérience H 832 (fig.2) pour la partie aliquote incubée en présence de L.histidine.

CONCLUSIONS.

Puisque l'histidine agit sur la recombinaison au niveau du locus ura2 dans une souche double hétéroallèlique ade3 ura2, on est tenté de conclure que l'effet de l'histidine ne s'explique pas par un contrôle commun de la transcription et de la recombinaison, mais plutôt par une

action générale de la L.histidine sur la recombinaison intragénique mitotique. Cette hypothèse sera d'autant plus probable qu'on aura pu étendre le phénomène à d'autres gènes que ura2. Nous avons pu prouver que l'histidine inhibe aussi la recombinaison au locus isoleucine (isol) dans un diploïde double hétéroallèlique ade3 isol. L'inhibition dans cette souche est de 92%.

Anciennement, cette étude fut tentée sur le diploïde ade3 thr2 (thréonine 2) avec la technique primitive de transfert sur membrane de cellophane (Clavilier 1962). Il n'avait pas alors été mis en évidence d'action de l'histidine sur la recombinaison au locus thr2. Nous n'avons pu ni confirmer ni infirmer ces résultats par notre technique, le diploïde utilisé n'étant pas viable dans nos conditions expérimentales (Hénaut et Luzzati non publié).

Une hypothèse du type opérateur (Luzzati 1965, Whitehouse 1966) ne peut pas rendre compte de ces résultats. L'effet de l'histidine sur la recombinaison intragénique mitotique est donc un effet général qui nécessite la présence de la mutation ade3 pour s'exprimer.

BIBLIOGRAPHIE.

Catcheside D.E.A. Regulation of the aml in Neurospora: Evidence of independent control of allelic recombination and gene expression Genetics 59 443-452 (1968).

Catcheside D.G. The control of genetic recombination in Neurospora crassa, p216-226, in W.J.Peacock and R.D.Brock (ed) Replication and recombination of genetic material. Austr. Acad.Sci., Canberra (1968).

Catcheside D.G., Austin B. The control of allelic recombination at histidine loci in Neurospora crassa. Amer. J. Bot. 56 685-690 (1969).

Clavilier L. Recherches sur la spécificité génétique de l'inhibition par l'histidine des réversions chez la levure Saccharomyces cerevisiae. Thèse de 3ème cycle, Faculté des Sciences de Paris (1962).

Clavilier L., Luzzati M., Slonimski P.P. Sur la conversion du gène ad3 chez la levure C.R.Soc.Biol. (Paris) 154 1970-1974 (1960).

Ephrussi B., Hottinguer H. Cytoplasmic constituents of heredity. On an unstable cell state in yeast. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 16 75-85 (1951).

Helling R.B. The effect of arabinose-specific enzyme synthesis on recombination in the arabinose genes of E.coli. Genetics 57 665-675 (1967).

Herman R.K. Effect of gene induction on frequency of intragenic recombination of chromosome and F. merogenote in E.coli K 12. Genetics 58 55-67 (1968).

Johnston J.R. Mortimer R.K. Use of snail digestive juice in isolation of yeast spores tetrads. J. Bact. 78 292 (1959).

Luzzati M. Inhibition spécifique de la recombinaison intragénique. Thèse Faculté des Sciences d'Orsay (1965).

Luzzati M., Clavilier L. Péré G. On the possibility of a specific repression at the genetic level (Abstr.) Proc. 11th Intern. Cong.Genet. 1 40 (1963).

Luzzati M., Clavilier L. Péré-Aubert G. Slonimski P.P. Contrôle biochimique de la recombinaison chez Saccharomyces cerevisiae. 1. Inhibition par la L.histidine de la recombinaison intragénique mitotique au locus ad3. Molec. Gen. Genetics 111 120-137 (1971).

Luzzati M., Clavilier L., Slonimski P.P. Inhibition par la L.histidine de la réversion prototrophe chez la levure diploïde hétéroallèlique pour le locus adénine-histidine. C. R. Acad. Sci. (Paris) 249 1412-1414.(1959).

Shestakov S. Barbour S.D. On the relationship between recombination and transcription of the lactose genes of E.coli K 12. Genetics 57 283-289 (1967).

Stamberg J. Genetic control of recombination in Schizophyllum commune: separation of the controlled and controlling loci. Heredity 24 306-309(1969).

Whitehouse H.L.K. An operator model of crossing over. Nature (Lond.) 211 708-713 (1966).

CHAPITRE III.

CONTROLE DE L'APTITUDE A RECOMBINER PENDANT LA PHASE VEGETATIVE.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication.

Hénaut A. et Luzzati M.

Contrôle de l'aptitude à recombiner pendant la phase végétative chez Saccharomyces cerevisiae.

Molec. Gen. Genetics. 116 26-34 (1972).

Nous avons conservé le texte de la publication dans ce chapitre.

Cette publication représente un essai d'interprétation de la recombinaison mitotique à l'aide du modèle classique de la "paraméïose" (Hurst et Fogel 1964). Toutes les expériences que nous exposons dans les chapitres suivants dérivent des conclusions de cet article et ce sont les difficultés que nous avons rencontrées dans l'interprétation de la "recombinaison gène centromère" qui nous ont conduit à réétudier dans le détail la recombinaison mitotique spontanée.

La conclusion fondamentale de cet article, c'est-à-dire que la carence en histidine dans une souche ade3 augmente la fréquence des cellules aptes à recombiner, probablement en provoquant l'appariement des chromosomes, a été confirmée par nos expériences ultérieures.

INTRODUCTION.

La recombinaison mitotique est sensible à un très grand nombre d'agents, tant physiques que chimiques. A priori, il est cependant possible de répartir ces agents en deux grandes classes (Holliday 1967): 1) Ceux qui agissent d'une façon précoce, affectant l'aptitude à recombiner, c'est-à-dire l'appariement des chromosomes ou la reconnaissance des "recombinator" .2) Ceux qui ont une action tardive, touchant le processus même de la recombinaison.

La carence en histidine augmentant fortement la recombinaison mitotique dans un diploïde hétéroallèlique au locus ade3 chez Saccharomyces cerevisiae (chapitre 11), le problème se pose de situer ce phénomène dans le cadre défini ci-dessus.

Cette question a fait l'objet d'une analyse purement formelle, exposée dans ce chapitre.

MATERIEL ET METHODES.

Mutants et souches

Dans ce chapitre, nous décrierons nos expériences faites avec les mutants suivants: ade 3-3 et ade3-6 (adénine$^-$ histidine$^-$) de Roman; iso 1.a et iso 1.b (isoleucine) de Anne Mire; ura2-30 (uracile-) de Lacroute.

Nous avons construit à partir de ces souches les diploïdes suivants: $\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade3\text{-}3}{ade3\text{-}6}\ \frac{iso\ 1\text{-}b}{iso\ 1\text{-}a}$ et $\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade3\text{-}3}{ade3\text{-}6}\ \frac{ura2\text{-}30}{+}$

Nous citons aussi des expériences faites par divers auteurs avec les mutants suivants: met 1 (méthionine$^-$), ura 3 (uracile$^-$) et his 1 (histidine$^-$) Hurst et Fogel (1964); ade 2 (adénine$^-$) Wilkie et Lewis (1963); can^R (résistance à la canavanine) Sherman et Roman (1963).

Les détails de ces expériences sont donnés dans les articles originaux.

Techniques

Les techniques spéciales utilisées pour l'étude de la recombinaison sont exposées en détail dans le chapitre 11. Elles permettent de contrôler certaines conditions physiologiques au moment de la recombinaison, grâce à une incubation en liquide. La numération des cellules recombinées se fait ensuite de façon classique sur boîte. Le schéma d'une expérience type est le suivant: du milieu synthétique liquide est ensemencé avec des cellules en phase exponentielle à une concentration de 10^6 cellules par millilitre. La suspension est répartie en différents aliquotes supplémentés en adénine, histidine, isoleucine, etc... Au bout de 20 heures à 28°C, la suspension est étalée sur du milieu solide permettant la numération des différentes catégories de cellules (recombinées et parentales, par exemple). Si l'on veut étudier l'effet d'une carence en un produit donné, il suffit de ne pas supplémenter une des parties aliquotes avec ce produit, les autres servant alors de témoin. Si l'on veut tester plusieurs besoins nutritionnels pour une colonie donnée, on utilise la technique classique des répliques sur velours.

Estimation de la fréquence de recombinaison intragénique méïotique. Nous avons utilisé la technique décrite par E.W.Jones (1964). La souche diploïde est cultivée trois jours en milieu de sporulation. Cette culture comprend un mélange de cellules diploïdes et d'asques, dont la fréquence est déterminée à l'hématimètre. (Il y a environ 70 à80% d'ascues). Des parties aliquotes de cette culture sont diluées dans de l'agar mou et coulées sur des boites du milieu convenable.

Il est classique de constater chez la levure une forte corrélation positive quand on étudie la recombinaison mitotique à deux loci différents. Ce fait est interprété comme une hétérogénéité de la population cellulaire, dont une partie seulement est apte à recombiner.

Entre deux sites donnés, la fréquence de recombinaison observée (fo) est fonction de la fréquence des cellules aptes à recombiner (fc) et de la fréquence de la recombinaison envisagée parmi ces dernières (f). Par la suite, cette dernière fréquence sera nommée fréquence corrigée de recombinaison.

L'analyse de nos résultats est basée sur les hypothèses suivantes: I) Une cellule peut-être apte à recombiner ou non apte à recombiner, ce caractère s'étendant à tous les chromosomes de la cellule. 2) Parmi les cellules aptes à recombiner, les recombinaisons en divers points éloignés du génome sont des évènements indépendants.

Ces hypothèses entraînent le système de relations suivant, entre les fréquences des simples recombinaisons A et B et la fréquence de la double recombinaison AB.

$$fo\ A = fc \times f\ A$$

$$fo\ B = fc \times f\ B$$

$$et\ fo\ AB = fc \times f\ AB = fc \times f\ A \times f\ B$$

$$d'où\ \frac{1}{fc} = \frac{fo\ AB}{fo\ A \times fo\ B}$$

(Ce rapport $\frac{fo\ AB}{fo\ A \times fo\ B}$ donne la valeur du coefficient de coïncidence)

$$et\ f\ A = \frac{fo\ AB}{fo\ B}$$

Les problèmes étant formellement identiques, ce raisonnement est du même type que celui fait pour estimer la compétence à la transformation chez Bacillus subtilis (Nester et Stocker 1963).

La signification physique des deux rapports ainsi définis est intéressante.

Tableau 1

$\frac{1}{fc}$		Fréquence corrigée				ile
		ade 3^+		iso 1^+		
OA	HA	OA	HA	OA	HA	
6	28	0,2	0,1	0,6	0,2	−
17	560	1,0	2,5	1,8	4,5	+
7	300	0,3	0,5	0,7	1,5	−
10	600	0,4	0,8	1,2	4,2	+
11	250	0,3	0,5	1,4	1,4	−
5	115	0,4	0,5	0,8	0,7	+
6	461	0,1	0,7	0,3	1,8	+
10	83	0,2	0,3	0,7	0,6	+
13	172	0,1	0,1	0,1	1,2	+
30	353	0,1	1,2	0,4	6,2	+
11,5	292	0,3	0,7	0,8	2,2	$\bar{x}$

Tableau 1

Recombinaison intragénique

Chaque ligne du tableau donne les résultats d'une expérience. Toutes les expériences ont été faites de façon indépendante, avec le diploïde $\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade3\text{-}3}{ade3\text{-}6}\ \frac{isol\text{-}b}{isol\text{-}a}$

Dans la ligne " $\bar{x}$ " sont notées les valeurs moyennes des différentes colonnes.

OA = milieu d'incubation liquide synthétique minimum + glucose 2% + adénine I μ g/ml.

HA = -id- OA + L.histidine IO μ g/ml

Ile = l'isoleucine est ajoutée au milieu d'incubation à une concentration finale de 60 μ g/ml quand l'expérience est notée "+" dans cette colonne.

Les nombres notés dans les différentes colonnes sont donnés par les rapports suivants:

$$\frac{1}{fc} = \frac{fo\ (ade3^+\ iso\ 1^+)}{fo\ (ade3^+) \times fo\ (iso\ 1^+)}$$

avec fc= fréquence des cellules aptes à recombiner

$$\text{Fréquence corrigée d'ade3}^+ = \frac{fo\ (ade3^+\ isol^+)}{fo\ (isol^+)}$$

$$\text{Fréquence corrigée d'isol}^+ = \frac{fo\ (ade3^+\ isol^+)}{fo\ (ade3^+)}$$

Les fréquences corrigées de recombinaison sont exprimées en %.

fo= fréquence observée du recombiné noté entre parenthèses.

1/fc		Fréquence corrigée				ile
		adé 3+		iso 1+		
OA	HA	OA	HA	OA	HA	
8	193	0,3	0,4	0,9	1,0	-
13	335	0,3	0,8	0,7	2,7	+

Tableau 2

Valeurs moyennes de la fréquence des cellules aptes à recombiner et des fréquences corrigées de recombinaison en fonction des conditions d'incubation.

Détail des légendes, voir tableau 1.

La fréquence corrigée de recombinaison mitotique est comparable à la fréquence de recombinaison méïotique estimée en tétrades. Les agents actifs sur le mécanisme même de la recombinaison modifieront la fréquence corrigée de recombinaison. En particulier ceux qui affectent la recombinaison méïotique, si les deux phénomènes sont de même nature.

La signification de l'aptitude à recombiner ne sera discutée qu'à la fin du paragraphe "Recombinaison gène-centromère".

RESULTATS.

I. Recombinaison intragénique (tableaux 1 et 2)

Pour déterminer les valeurs de la fréquence des cellules aptes à recombiner et les fréquences corrigées de recombinaison, nous avons utilisé deux couples d'allèles physiquement indépendants: ade3 qui est localisé sur le chromosome VII et isol qui est sur le chromosome V (Hawthorne et Mortimer 1960). Nous avons construit le diploïde $\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade3\text{-}3}{ade3\text{-}6}\ \frac{isol.b}{isol.a}$.

Le tableau 1 résume dix expériences indépendantes. La valeur moyenne de la fréquence des cellules aptes à recombiner calculée dans la partie aliquote ayant été carencée en histidine durant l'incubation en liquide (notée OA) est beaucoup plus forte que celle de la partie aliquote contenant de l'histidine (notée HA). La différence de 1/11,5 pour OA contre 1/292 pour HA est significative au seuil 0,1%. Par contre, les conditions d'incubation n'influent pas sur les fréquences corrigées de recombinaison. Tout au plus, celles-ci sont-elles légèrement plus élevées lorsque l'incubation a lieu en présence d'histidine. Les différences (0,7% contre 0,3% pour $ade3^+$ et 2,2% contre 0,8% pour $isol^+$) ne sont pas significatives au seuil 5%.

L'accroissement par un facteur IO de la fréquence des cellules recombinées dans une population de cellules diploïdes hétéroallèliques au locus ade3 au cours d'

(chapitre II) est donc dû uniquement à l'augmentation de la fréquence des cellules aptes à recombiner.

La carence en isoleucine, qui peut être provoquée grâce à la mutation du gène isol, ne modifie ni la fréquence des cellules aptes à recombiner ni la fréquence corrigée de recombinaison. Le tableau 2 donne les valeurs moyennes de ces différents rapports dans le cas d'expériences faites en absence ou en présence d'isoleucine (Ces moyennes sont calculées à partir des expériences du tableau 1).

Dans cette souche, il y a au cours de la méïose 0,3% des tétrades qui contiennent une spore recombinée ade3^{+} et 0,9% une spore recombinée isol^{+}. L'égalité de ces fréquences avec les fréquences corrigées de recombinaison tirées des expériences ci-dessus laisse supposer l'identité des mécanismes de recombinaison mitotique et méïotique.

Tout se passe comme si la recombinaison mitotique était consécutive à un début de méïose qui s'interromprait après le stade pachytène et avant la métaphase de première division. Dans un diploïde homozygote pour une mutation du gène ade3, la carence en histidine déclencherait cette"paraméïose" (terme créé par Hurst et Fogel 1964). Le fait qu'il n'y ait que 10% des cellules qui soient aptes à recombiner en carence d'histidine pourrait trouver son origine dans la nature asynchrone de la population cellulaire utilisée. Cette valeur indiquerait alors que la phase sensible pendant laquelle les cellules sont aptes à recombiner dure un dizième du temps de génération de la levure, soit une dizaine de minutes.

II. Recombinaison gène centromère (tableau 3)

L'égalité des fréquences corrigées de recombinaison mitotique et des fréquences de recombinaison méïotique, dans le cas de la recombinaison intragénique est favorable à l'hypothèse de la "paraméïose". Un crossing over entre un gène et son centromère,

Fréquence observée des ura⁻				1/fc		Fréquence des adé 3⁺			
parmi les adé 3⁺		dans la population totale				observée en 10^{-6}		corrigée en %	
OA	HA	OA	HA	OA	HA	OA	HA	OA	HA
58/1932 3 %	31/409 7,5 %	3/841 0,35 %	1/3353 0,03 %	8,6	250	880	50	0,8	1,2
33 %	33 %			Fréquence théorique				0,3 %	

Tableau 3

Recombinaison gène centromère.

$\frac{I}{fc}$ = $\frac{\text{fréquence des ura}^- \text{ parmi les ade3}^+}{\text{fréquence des ura}^- \text{ dans la population totale}}$

Fréquence théorique = fréquence attendue dans l'hypothèse de la paraméïose.

qui conduirait à un asque post-réduit pour ce gène au cours d'une méïose, n'a qu'une chance sur deux d'aboutir à une recombinaison visible, à cause de la division des centromères au cours de la mitose. Parmi les cellules aptes à recombiner, la fréquence attendue des cellules recombinées décelables (cellules homozygotes pour l'allèle récessif) devra donc être égale à la moitié de la fréquence de post-réduction du gène envisagé.

Nous avons choisi comme marqueur de la recombinaison gène centromère la mutation ura2-30, car le gène ura2 est indépendant de son centromère (66% de post-réduction).

Le tableau 3 résume les résultats de l'expérience faite avec le diploïde $\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade3-3}{ade3-6}\ \frac{ura2-30}{+}$. La fréquence des auxotrophes pour l'uracile est mesurée parmi les cellules ade3$^+$ issues de la souche de départ par une recombinaison survenue au cours des 20 heures d'incubation. La valeur de cette fréquence est indépendante des conditions d'incubation et est de l'ordre de 5%. Elle correspond à la fréquence corrigée de la recombinaison gène centromère. La fréquence des cellules auxotrophes pour l'uracile peut aussi être mesurée au sein de la population totale. Dans ce cas, la fréquence observée est plus faible que la fréquence mesurée ci-dessus, et elle dépend des conditions d'incubation. Elle est de 0,35% en cerence d'histidine et 0,03% en présence. Ces différences proviennent de ce que la fréquence des cellules aptes à recombiner (fc) est inférieure à 1 et varie suivant les conditions d'incubation. Les valeurs de $\frac{1}{fc}$ calculées dans les deux conditions d'incubation ne sont pas différentes de celles données par la recombinaison intragénique. Elles permettent de calculer la fréquence corrigée de recombinaison pour le gène ade3 en partant de la fréquence observée. La fréquence des ade3$^+$ ainsi calculée ne dépend pas des conditions d'incubation et n'est pas différente de celle établie dans le diploïde $\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade3-3}{ade3-6}\ \frac{iso\ 1-b}{iso\ 1-a}$ (cfl.Recombinaison intragénique).

L'identité des valeurs de la fréquence des cellules aptes à recombiner calculées par le moyen de la recombinaison intragénique, ou par celui de la recombinaison gène-centromère et la constance de la fréquence corrigée des ade3^{+} confirme bien l'hypothèse d'une action de l'histidine sur l'aptitude à recombiner dans une souche ade3.

Il est donc important de connaitre la signification physique de l'aptitude à recombiner.Pour qu'une recombinaison puisse se produire, il faut que les chromosomes homologues s'apparient, tout au moins dans la région concernée. Ensuite, tout un système enzymatique est nécessaire pour que se réalise la recombinaison, rendue possible par la mise en présence des régions homologues. L'appariement étant la première condition nécessaire pour la recombinaison, ce doit être le facteur limitant dans les cellules en phase végétative. En effet, il n'y a pas d'appariement de type méïotique, avec différenciation d'un complexe synaptonématique, au cours des prophases mitotiques (Henderson 1970). Ceci étant, il est légitime de penser que toute augmentation de la fréquence des cellules aptes à recombiner sous l'influence d'un agent quelconque traduit une action de ce dernier sur l'appariement des chromosomes homologues. La carence en histidine dans un diploïde hétéroallèlique au locus ade3 provoquerait donc l'appariement des chromosomes homologues. Cet appariement entraine des recombinaisons mitotiques intragéniques et intergéniques.Alors que les premières ont une fréquence égale à la fréquence méïotique, les recombinaisons gène-centromère ont une fréquence apparente beaucoup plus faible qu'en méïose. En effet, il n'y a que 5% d'ura2 alors que la fréquence prévue dans l'hypothèse de la "paraméïose" est de 33%. Cette apparente contradiction entre les fréquences de recombinaison intragénique et intergénique pose un problème. Une des solutions possibles est presque triviale: on peut imaginer qu'après un crossing-over la répartition des chromatides dans les noyaux fils ne se fait pas au hasard et que les chromatides rema-

Fréquence observée				$\frac{1}{fc}$ calculé avec		Fréquence des his 1^+	
parmi les his 1		dans la population totale				observée en 10^{-6}	corrigée en %
mét 1^-	ura 3^-	mét 1^-	ura 3^-	mét 1^-	ura 3^-		
$\frac{15}{60}$ 25 %	$\frac{11}{60}$ 18 %	$\frac{3}{2000}$ 0,15 %	$\frac{3}{2000}$ 0,15 %	167	185	3.0	0,5
33 %	5 %			Fréquence théorique			0,5 %

Tableau 4

Tableau établi avec les résultats de recombinaison spontanée tirés de l'article de Hurst et Fogel (I964).

Pour les détails de la légende. voir texte et tableau 3.

niées restent associées. Les cellules filles ont alors un phéno-
type parental.

DISCUSSION.

La liaison entre la recombinaison mitotique intragénique et la recombinaison intergénique mitotique a été étudiée chez Saccharomyces cerevisiae par plusieurs auteurs. En utilisant leurs résultats, il doit être possible de vérifier la généralité de ce qui précède.

Les données publiées sont le plus souvent les suivantes: fréquence de la recombinaison gène centromère pour divers marqueurs calculée parmi la population totale et parmi les cellules ayant subi une recombinaison intragénique (tableau 4). Le tableau 4 est tiré des résultats de Hurst et Fogel (I964) sur la recombinaison gène centromère des marqueurs met1 et ura3, dans un diploïde hétéroallèlique his1-1 x his1-7. Parmi tous les gènes qui sont à l'état hétérozygote dans les diploïdes utilisés, nous n'avons retenu que ces deux ci car ils sont indépendants du gène his1. La fréquence des cellules aptes à recombiner est calculée de la même façon que dans notre expérience avec le diploïde $\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade3-3}{ade3-6}\ \frac{ura2-30}{+}$,

c'est-à-dire qu'elle est égale au rapport

$\frac{\text{fréquence parmi la population totale}}{\text{fréquence parmi les recombinés his}}$ (cf 11.Recombinaison gène centromère). La valeur de $\frac{1}{fc}$ (I67 quand on calcule avec met1, I85 avec ura3) calculée avec les résultats de Hurst et Fogel est la même que celle mesurée dans nos expériences dans la partie aliquote incubée en présence d'histidine (Hurst et Fogel arrivent à une valeur voisine en utilisant un autre raisonnement). Nous pouvons calculer aussi la fréquence corrigée de recombinaison pour le couple his1-1 his1-7. La fréquence corrigée de recombinaison mitotique entre ces deux sites est égale à la fréquence méïotique (0,5%). Par contre, il ne semble pas y avoir de relation entre

fréquences corrigées de recombinaison pour les marqueurs met1 et ura3 et leurs distances aux centromères estimées au cours de la méïose.

L'irradiation aux U.V. est la technique la plus utilisée pour augmenter la fréquence de recombinaison. Wilkie et Lewis (1963) ont ainsi pu montrer que dans une cellule capable de recombinaison, il y a appariement de tous les chromosomes homologues et que les recombinaisons qui ont lieu sur deux chromosomes différents sont indépendantes. Enfin, aux doses utilisées, 9% des cellules en phase stationnaire sont aptes à recombiner sous l'action des U.V. Le taux de cellules aptes peut passer à 20% quand la dose d'U.V. augmente, mais la mortalité est telle que l'interprétation des résultats devient très délicate.

Une dernière technique qui donne des informations recoupant nos résultats est l'induction de la méïose en milieu de sporulation, avec retour en phase végétative avant la fin de la prophase de première division. Wilkie et Lewis (1963) trouvent qu'en dehors de toute irradiation, l'induction de la méïose augmente vingt fois la fréquence observée de recombinaison entre le gène ade2 et le centromère. Sherman et Roman (1963) font une étude cinétique de ce phénomène en mesurant la recombinaison intragénique au locus isol et la recombinaison entre le gène can^R et son centromère. Ils montrent que huit heures en milieu de sporulation font passer le taux des $isol^+$ de 19 10^{-6} à 540 10^{-6}, soit un facteur 28, alors que 99% des cellules restent diploïdes. La fréquence des $isol^+$ n'augmente alors plus beaucoup jusqu'à la maturité des asques. Le plateau n'est atteint pour la fréquence de recombinaison gène centromère du marqueur can^R qu'après dix à douze heures en milieu de sporulation. Les auteurs concluent qu'il existe deux mécanismes de recombinaison, un affectant la recombinaison intragénique et l'autre la recombinaison intergénique.

Cet ensemble de travaux tend à montrer que la recombinaison mitotique chez la levure Saccharomyces cerevisiae présente les

I) Dans une population cellulaire en phase végétative, la fréquence des cellules aptes à recombiner est de 1/250. Cette fréquence peut être augmentée 25 fois sous diverses influences: les radiations U.V., l'induction de la méïose ou la carence en histidine dans les diploïdes homozygotes pour une mutation du gène ade3.

II) Dans une cellule compétente, tous les chromosomes homologues s'apparient et les recombinaisons survenant dans deux paires de chromosomes différentes sont indépendantes.

III) La fréquence de recombinaison intragénique mitotique n'est pas différente de la fréquence méïotique. Par contre, il n'est pas certain qu'il en soit de même pour la recombinaison intergénique.

CONCLUSION.

L'augmentation du taux de cellules aptes à recombiner par le moyen de la carence en histidine dans une souche ade3 facilite l'étude de la recombinaison mitotique spontanée, puisqu'il est possible ainsi de travailler sur une population cellulaire présentant un taux élevé de recombinaison.

Cette étude peut être poursuivie dans plusieurs directions. Au cours des chapitres suivants nous exposerons nos expériences sur la physiologie (chapitre IV), les caractères ultrastructuraux (chapitre V et sur l'aspect formel de la recombinaison mitotique spontanée (chapitre VI).

BIBLIOGRAPHIE.

Hawthorne D.C. and Mortimer R.K. : Chromosome mapping in Saccharomyces : centromere linked genes. Genctics 45, I085-III0 (I960).

Henderson S.A. : Chromosome pairing, chiasmata and crossing-over in "Handbook of molecular cytology" A.Lima-De-Faria edit. American Elsevier I970. pp 326-357.

Holliday R. : Genetic recombination in Fungi in "International Conference on replication and recombination of genetic material" Canberra I967.

Hurst D.D. and Fogel S. : Mitotic recombination and heteroallelic repair in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 50, 435-458 (I964).

Jones E.W. : Ph D thesis, University of Washington. Seattle (1964).

Nester E.W. and Stocker B.A.D. : Biosynthetic latency in early stages of DNA transformation in Bacillus subtilis. J. Bact. 86, 785-796 (I963).

Sherman F. and Roman H. : Evidence for two types of allelic recombination in yeast. Genetics 48, 255-26I (I963).

Wilkie D. and Lewis D. : The effect of ultraviolet light on recombination in yeast. Genetics 48, I70I-I7I6 (I963).

CHAPITRE IV.

ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA RECOMBINAISON MITOTIQUE.

TABLEAU 1.

Souche	Accroissement brut			Accroissement réduit			% d'inhibition	Activité spécifique	
	témoin	OA	HA	témoin	OA	HA		his 0	his 10^{-3}M
$\frac{ade3.3\ his6}{ade3.6\ his6}$	25	150	35	0	125	10	92	21	8
$\frac{ade3.3\ his6}{ade3.6\ +}$	24	140	25	0	116	1	99	80	8

L'activité spécifique est exprimée en mμM AICAR synthétisé/ mg protéine/ heure. Cette réaction est dosée selon la technique de Klopotowski, Luzzati et Slonimski (1960).

L'accroissement de la fréquence des $ade3^+$ est calculé entre le début de l'incubation et 44 heures. Il est exprimé par rapport à 10^6 cellules auxotrophes. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule:

$$\frac{\text{Accroissement réduit OA} - \text{Accroissement réduit HA}}{\text{Accroissement réduit OA}} \times 100$$

(OA = incubation en absence d'histidine; HA = incubation en présence d'hidtidine. Ce type d'expérien-

Le"système ade3" permet l'étude de la physiologie de la recombinaison mitotique. En effet, avec cette technique, la recombinaison se produit au cours d'une incubation en milieu synthétique liquide, la mise en évidence des différentes catégories de cellules se faisant ensuite, de façon classique, sur boîte.

La justification expérimentale et les détails de cette technique sont donnés dans le chapitre 11.

1. Mode d'action de l'histidine.

La carence en histidine augmente la fréquence des cellules aptes à recombiner dans une population de cellules diploïdes hétéroallèliques au locus ade3 (chapitre 111). Par ailleurs, il est démontré que l'histidine inhibe la première étape de sa chaîne de biosynthèse (Klopotowski, Luzzati et Slonimski 1960), empêchant ainsi la formation d'AICAR (5 amino 4 imidazolecarboxamide ribotide). Nous avons voulu savoir si c'est par l'intermédiaire de cette rétroinhibition que l'histidine agit sur la recombinaison mitotique.

Une mutation bloquant la chaîne de l'histidine avant l'étape au cours de laquelle se forme l'AICAR a les mêmes conséquences, pour l'AICAR, que la rétroinhibition par l'histidine. Si c'est l'AICAR qui est responsable des phénomènes que l'on observe au niveau de la recombinaison, une telle mutation empêchera donc l'accroissement de la fréquence de recombinaison que provoque d'habitude la carence en histidine. Et, dans cette hypothèse la fréquence de recombinaison mitotique dans une suspension de cellules diploïdes $\frac{ade3.3}{ade3.6}\ \frac{his}{his}$ sera faible et insensible à l'effet de l'histidine.

Cette hypothèse a été testée avec un diploïde $\frac{ade3.3}{ade3.6}\ \frac{his6}{his6}$. La mutation his6 provoque la perte de l'activité BBM 11 isomérase (N.(5' phosphoribosylformimino) 5 amino.1 (5" phosphoribosyl) 4 imidazolecarboxamide isomérase EC 5.3.1.16. Jones, résultats non publiés). Nous avons vérifié

TABLEAU 2.

	Fréquence des ade3^{+} par 10^{6} cellules			
Concentration en L.histidine (µg/ml)	0		10	
Concentration en formiate (µg/ml)	0	10	0	10
2° jour	50	52	61	67
6° jour	771	749	184	112

que dans le diploïde utilisé, il n'y a pas formation d'AICAR, par la chaîne de l'histidine. Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau 1. Il y a un net accroissement de la fréquence de recombinaison en absence d'histidine quelque soit le génotype du diploïde utilisé.

L'histidine n'agit donc pas sur l'aptitude à recombiner au cours de la phase végétative par l'intermédiaire de la rétroinhibition de sa chaîne de biosynthèse. On peut imaginer que l'histidine agit au niveau des enzymes d'interconversion des coenzymes foliques (méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase 11 ?). Mais ce point sera difficile à établir.

2. Action du formiate.

Chez Micrococcus aerogenes le formiate de sodium et l'histidine augmentent tous deux d'un facteur 10 le niveau de formyltétrahydrofolate synthétase et de méthènyltétrahydrofolate cyclohydrolase (Whiteley 1967). Cette analogie fonctionnelle du formiate et de l'histidine à un niveau enzymatique justifie l'étude de l'action du formiate sur la recombinaison mitotique dans un diploïde $\frac{ade3.3}{ade3.6}$.

Nous avons testé l'effet du formiate en étalant une suspension de cellules $\frac{ade3.3}{ade3.6}$ sur des boîtes de milieu minimum diversement supplémenté. Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau 2. Le formiate ne modifie pas l'effet de l'histidine sur la recombinaison. Nous avons aussi montré que les cellules $\frac{ade3.3}{ade3.6}$ ne se multiplient pas dans un milieu supplémenté en adénine et en formiate.

Le formiate n'a aucune action sur la recombinaison mitotique.

Ce résultat négatif ne permet pas d'affirmer qu'il n'existe pas d'autres produits qui pourraient jouer le rôle de l'histidine sur la recombinaison mitotique. Luzzati (1965) avait mis en évidence un certain effet de la méthionine.

TABLEAU 3.

	Fréquence des (+) pour 10^6 cellules													
	ade3						isol							
Concentration en L.histidine (µg/ml)	0			10			0			10		
Concentration en adénine (µg/ml)	0	1	10	0	1	10	0	1	10	0	1	10
Expérience												
856	59	1014	1319	17	22	38	203	1430	1526	37	61	52
857	90	1434	1064	10	28	17	232	1503	1062	27	67	72
858	125	769	1105	15	17	23	235	976	898	25	36	52

La fréquence des prototrophes est calculée au temps 44 heures après le début de l'incubation en liquide.

Toutes les expériences sont faites en absence d'isoleucine dans le milieu d'incubation.

Malgré leur aspect décourageant, ce sont des recherches de ce type qui peuvent faciliter la mise en évidence du mécanisme primaire de l'action de l'histidine.

3. Rôle de l'adénine.

Dès les tous débuts de l'étude de l'effet de l'histidine sur la recombinaison au locus ade3, il fut établi que cette recombinaison nécessitait des traces d'adénine (Luzzati, Clavilier et Slonimski 1959, 1960). Nous avons repris ce problème en utilisant les facilités qu'offre la recombinaison en milieu synthétique liquide, et la possibilité que l'on a de calculer la fréquence des cellules aptes à recombiner et la fréquence des recombinaisons parmi celles-ci, lorsqu'on emploie une souche diploïde hétéroallèlique à deux loci indépendants (chapitre III).

Sur le plan expérimental, nous avons ensemencé avec une suspension de cellules $\frac{ade3.3\ isol.a}{ade3.6\ isol.b}$ différents erlens de milieu minimum liquide supplémenté ou non en histidine et contenant des concentrations variables d'adénine. L'expérience est faite en absence d'isoleucine, ce qui autorise des concentrations élevées d'adénine et d'histidine sans que les cellules auxotrophes ne se divisent. Les effectifs des différentes catégories de cellules sont ensuite calculées après étalement sur des boîtes de milieu minimum supplémenté en adénine et en histidine pour les $isol^+$, en histidine et en isoleucine pour les $ade3^+$ et avec les trois produits pour les auxotrophes (ade3 isol). Trois expériences indépendantes sont résumées dans le tableau 3. Elles montrent qu'en absence d'adénine, la fréquence de recombinaison est très faible aux deux loci envisagés, et qu'elle varie peu en fonction de la concentration en histidine. Il suffi d'une concentration d'adénine de 1 μg/ml ($7\ 10^{-6}$M) pour que l'on retrouv "l'effet histidine". Le phénomène persiste intégralement pour les concentrations élevées d'adénine.

Putrament (1967) a montré que des traces d'adénine sont aussi nécessai

TABLEAU 4.

Milieu d'incubation		Fréquence observée		
adénine 1µg/ml	histidine 10µg/ml	$ade3^+$	$isol^+$	$ade3^+$ $isol^+$
-	-	$56\ 10^{-6}$ $\frac{258}{4,6}\ 10^{-6}$	$86\ 10^{-6}$ $\frac{397}{4,6}\ 10^{-6}$	0 $\frac{0}{4,6}\ 10^{-7}$
-	+	$51\ 10^{-6}$ $\frac{256}{5}\ 10^{-6}$	$60\ 10^{-6}$ $\frac{300}{5}\ 10^{-6}$	$2\ 10^{-8}$ $\frac{1}{5}\ 10^{-7}$

Cette expérience a été faite en absence d'isoleucine dans le milieu d'incubation.

TABLEAU 5.

Milieu d'incubation				
adénine 1 µg/ml	histidine 10 µg/ml	$\frac{fade3^+ \; isol^+}{fade3^+ \times fisol^+}$	$\frac{fade3^+ \; isol^+}{fisol^+}$	$\frac{fade3^+ \; isol^+}{fade3^+}$
-	-	0	0	0
-	+	6,4	$0,3\ 10^{-3}$	$0,4\ 10^{-3}$
+	-	8	$3\ 10^{-3}$	$9\ 10^{-3}$
+	+	193	$4\ 10^{-3}$	$10\ 10^{-3}$

Toutes ces expériences sont faites en absence d'isoleucine dans le milieu d'incubation. Les expériences faites en absence d'adénine sont décrites dans le tableau précédent et celles faites en présence de 1 µg/ml d'adéni dans le tableau 1 du chapitre III.

res chez Aspergillus nidulans pour que la recombinaison mitotique puis avoir lieu.

En absence d'adénine, la recombinaison mitotique ne peut avoir lieu. Il est intéressant de savoir si cette carence bloque le mécanisme qui rend les cellules aptes à recombiner ou si l'adénine est indispensable pour que la recombinaison elle-même se déroule normalement.

Pour cela, nous avons fait une expérience identique à celles décrite ci-dessus, mais cette fois, nous avons mesuré aussi bien la fréquence des doubles recombinés $ade3^+$ $isol^+$ que la fréquence des $ade3^+$ et des $isol^+$. Les résultats de l'expérience réalisée en carence d'adénine son résumés dans le tableau 4. On remarque tout d'abord que l'histidine n' pas d'effet sur la recombinaison. Il faut noter ensuite que la très fa ble fréquence des doubles recombinés $ade3^+$ $isol^+$ (1 pour $5\ 10^7$ cellule testées, sur milieu minimum supplémenté en histidine, pour la partie aliquote cultivée en présence d'histidine, 0 sur $4{,}6\ 10^7$ cellules pour l'aliquote cultivé en carence d'histidine) limite beaucoup les informa tions que l'on peut tirer des rapports $\frac{fade3^+\ isol^+}{fade3^+ \times fisol^+}$, $\frac{fade3^+\ iso}{fisol^+}$ et $\frac{fade3^+\ isol^+}{fade3^+}$. Pour rendre ces rapports significatifs, il faudrait tester 100 fois plus de cellules, et ceci présente d'énormes difficult Nous discuterons à la fin de ce paragraphe des possibilités qui existe de modifier cette expérience. Malgré tout,il est clair que le rapport $\frac{fade3^+\ isol^+}{fade3^+ \times fisol^+}$ n'est pas de l'ordre de 200, comme c'est le cas dans une population de cellules non induites à recombiner (tableau 5 et cha pitre 111).

Si nous faisons l'hypothèse que, dans une cellule apte à recombiner, des recombinaisons peuvent se produire sur tous les chromosomes simult nément et que les recombinaisons à deux loci distants sont indépendant comme le montre l'expérience dans le cas de la recombinaison en présen d'adénine (chapitre Vl), nous pouvons écrire le système d'équations suivant (chapitre 111):

$fo\ A = fc \times f\ A$ avec fo = fréquence observée

$fo\ B = fc \times f\ B$ fc = fréquence des cellules aptes à recombiner

$fo\ AB = fc \times fA \times fB$ f = fréquence de la recombinaison parmi ces cellules

d'où

$$\frac{fo\ AB}{fo\ A \times fo\ B} = \frac{1}{fc}$$ (c'est le rapport $\frac{fade3^+\ isol^+}{fade3^+ \times fisol^+}$)

et

$$\frac{fo\ AB}{fo\ B} = f\ A$$

$$\frac{fo\ AB}{fo\ A} = f\ B$$

(Le rapport $\frac{fade3^+\ isol^+}{fisol^+}$ est donc égal à la fréquence des $ade3^+$ parmi les cellules aptes à recombiner et le rapport $\frac{fade3^+\ isol^+}{fade3^+}$ à celle des $isol^+$).

Dans cette hypothèse, nous pouvons dire que la carence en adénine rend les cellules aptes à recombiner, peut-être par une action au niveau du métabolisme intermédiaire, comme nous le supposons pour l'histidine, et que son effet est épistatique sur celui de l'histidine. Dans ces cellules rendues aptes à recombiner, le mécanisme de la recombinaison est affecté par la carence en adénine. Ceci n'est pas étonnant, la recombinaison intragénique mettant probablement en jeu une synthèse d'ADN.

Mais nous ne sommes pas obligés de faire l'hypothèse de l'indépendance des recombinaisons. Dans ce cas, notre système d'équations est le suivant

$fo\ A = fc \times f\ A$

$fo\ B = fc \times f\ B$

et au lieu de

$fo\ AB = fc \times fA \times f\ B$

comme dans le cas où les recombinaisons aux deux loci sont indépendantes

la fréquence observée du double évènement devient:

$$fo\ AB = fc \times fA \times fd \times fB$$

avec fd = probabilité d'une deuxième recombinaison dans la même cellule.

Le rapport $\frac{fo\ AB}{fo\ A \times fo\ B}$ n'est plus égal à $\frac{1}{fc}$, comme dans la première hypothèse, mais à $\frac{fd}{fc}$, il peut donc être inférieur à 1. Et le rapport $\frac{fo\ AB}{fo\ B}$ est maintenant égal à fd f A, ce qui fait qu'on ne peut plus connaître la fréquence de la recombinaison A parmi les cellules aptes à recombiner.

La faible valeur du rapport $\frac{fade3^+\ isol^+}{fade3\ \times fisol}$ dans l'expérience en carence d'adénine fait qu'il n'est pas possible, à priori, d'admettre l'indépendance des recombinaisons dans une cellule. Si les recombinaisons à deux loci ne sont pas indépendantes les conclusions de cette expérience sont les suivantes:

En carence d'adénine, la fraction du génôme qui peut recombiner au cours d'un cycle cellulaire est faible, peut-être parce que l'appariement des chromosomes ne se fait que dans une petite région, peut-être parce qu'un produit essentiel pour la recombinaison n'est synthétisé qu'en quantité insuffisante (l'hypothétique "recombinase"?). Rien n'empêche de penser que la recombinaison elle-même se déroule normalement.

Il est possible de trancher entre ces deux hypothèses en étudiant la recombinaison avec un diploïde hétéroallèlique à trois loci différents. En effet, il est alors possible d'établir un système d'équations dont la solution dépend de l'hypothèse de départ.

1) Dans une cellule apte à recombiner, toutes les recombinaisons sont indépendantes

$$\frac{fo\ ABC}{fo\ AB} = \frac{fc \times f\ A \times f\ B \times f\ C}{fc \times f\ A \times f\ B} = f\ C$$

$$\frac{fo\ AC}{fo\ A} = \frac{fc \times f\ A \times f\ C}{fc \times f\ A} = f\ C$$

d'où

$$\frac{fo\ ABC}{fo\ AB} = \frac{fo\ AC}{fo\ A}$$

2) Dans une cellule apte, un facteur quelconque limite le nombre des recombinaisons

$$\frac{fo\ ABC}{fo\ AB} = \frac{fc \times f\ A \times fd \times f\ B \times fd' \times f\ C}{fc \times f\ A \times fd\ f\ B} = fd' \times fC$$

avec fd = probabilité d'une deuxième recombinaison et fd' = probabilité d'une troisième recombinaison ($fd > fd'$)

$$\frac{fo\ AC}{fo\ A} = \frac{fc \times f\ A \times fd \times f\ C}{fc \times f\ A} = fd \times f\ C$$

d'où

$$\frac{fo\ ABC}{fo\ AB} < \frac{fo\ AC}{fo\ A} \quad .$$

Pour apporter une solution définitive au problème du rôle de l'adénine, il faudrait donc recommencer notre étude avec des cellules diploïdes hétéroallèliques à trois loci différents. A cause des grandes difficultés que l'on rencontre pour maîtriser "l'effet histidine" dans des grands volumes de culture, cette expérience n'est possible que si on fait appel à un agent chimique pour induire la recombinaison.

4. Détermination de la période sensible à l'action de l'histidine au cours du cycle cellulaire.

En carence d'histidine, 10% des cellules sont aptes à recombiner (chapitre III). Nous avons tenté d'augmenter cette proportion pour faciliter les études biochimiques.

L'hypothèse la plus couramment admise attribue le fait que la fréquence des cellules aptes à recombiner plafonne vers 0,1, à l'asynchronisme de la population cellulaire. Il doit donc exister une ou plusieurs phases au cours du cycle cellulaire pendant lesquelles les cellules sont sensibles à l'action des agents induisant l'aptitude à recombiner.

Nous avons utilisé la technique de synchronisation de Wildenberg (1970). Elle repose sur la sélection de cellules de taille uniforme par centrifugation différentielle. Pratiquement, la technique consiste à partir

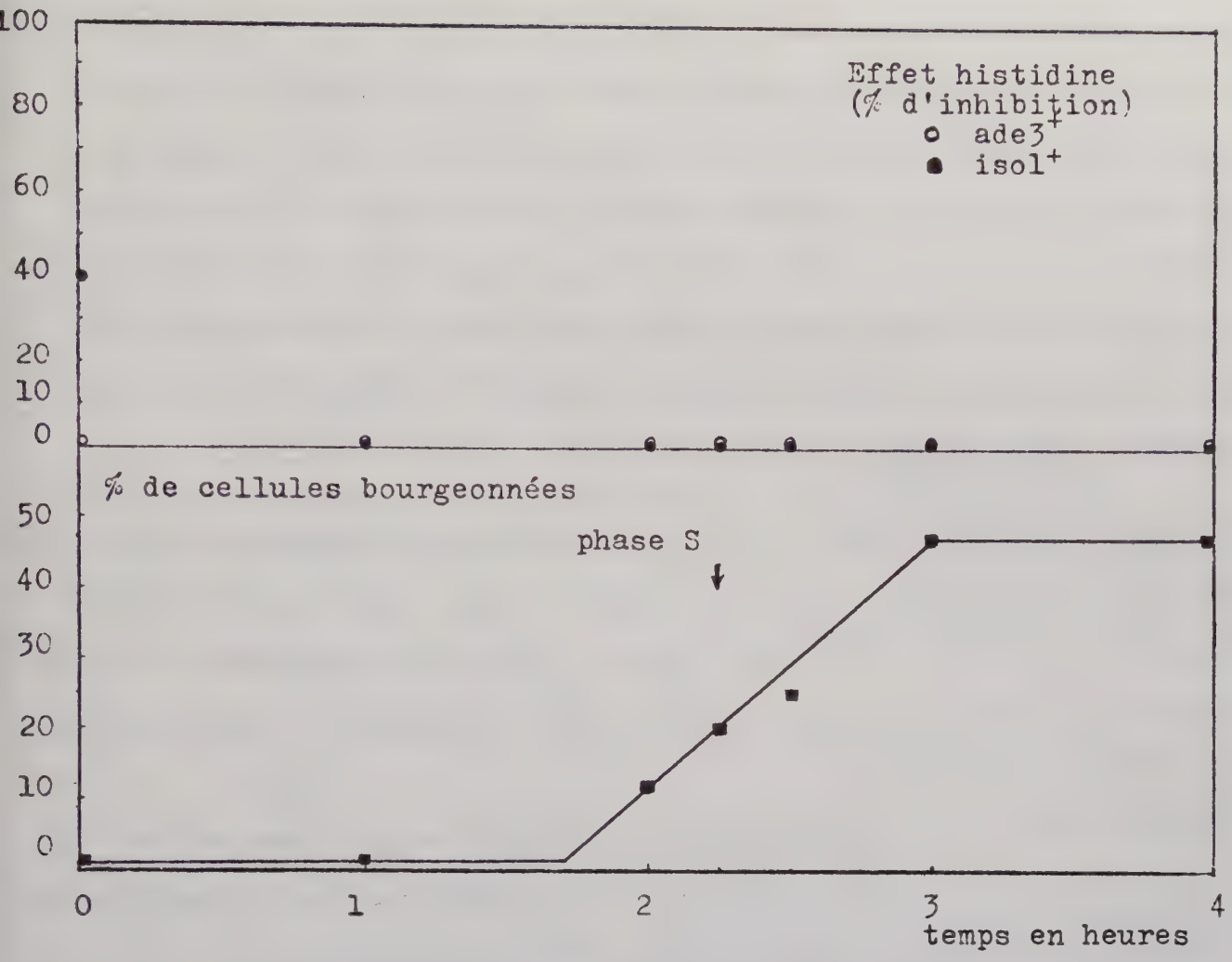


Figure 1.

Sensibilité des cellules à "l'effet histidine" au cours du cycle cellulai

d'une culture en phase stationnaire que l'on centrifuge lentement pour que seules les petites cellules restent dans le surnageant. Cette population de petites cellules est ensuite resuspendue dans du milieu frais et remise à se multiplier à 28°C. L'apparition des premiers bourgeons se fait au bout de 105 minutes. Elle marque le début de la phase S. Le nombre des cellules bourgeonnées se stabilise au bout de 180 minutes. Des parties aliquotes de cette culture synchrone prises à différents temps sont utilisées pour réaliser une expérience de recombinaison en liquide selon la technique décrite au chapitre II. Nous avons utilisé le diploïde $\frac{ade3.3\ isol.a}{ade3.6\ isol.b}$.

La figure 1 montre comment varie le pourcentage d'inhibition par l'histidine de la recombinaison aux loci ade3 et isol, donc la sensibilité des cellules à l'action de l'histidine en fonction de la phase du cycle cellulaire. A aucun des points testés, sauf peut-être le temps 0, on ne trouve d'effet histidine.

A première vue, ce résultat confirme l'hypothèse que nous avions fait. Il existe au cours du cycle cellulaire des phases au cours desquelles les cellules ne sont pas sensibles à"l'effet histidine", et on peut espérer que des essais plus nombreux permettraient de trouver la phase sensible. Mais en réalité, il n'est pas sûr que des cellules préparées par cette technique sont dans un état physiologique permettant l'action de l'histidine. D'autre part, il n'a pas semblé utile de consacrer un effort plus grand à cette étude car le nombre de cellules synchrones que l'on peut obtenir est limité. Le rendement est de 1%, c'est-à-dire que 10^9 cellules en phase stationnaire donnent après centrifugation 10^7 cellules synchrones. Comme il faut pour les études biochimiques 10^{10} cellules, les quantités de culture à centrifuger seraient énormes. Les difficultés seraient alors disproportionnées avec le gain obtenu sur le plan biochimique.

BIBLIOGRAPHIE.

Klopotowski T., Luzzati M. et Slonimski P.P. Evidence for a new step between ATP and 5 amino 4-imidazolecarboxamide ribotide in the cyclic process of histidine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 3 150-154 (1960).

Luzzati M. Thèse (1965).

Luzzati M., Clavilier L. et Slonimski P.P. Inhibition by histidine of the prototrophic reversion in a diploid heteroallelic for the ade3 locus. Microbial. Genetics Bulletin 17 11-12 (1960).

Luzzati M., Clavilier L. et Slonimski P.P. Inhibition par l'histidine de la réversion prototrophe chez la levure diploïde hétéroallèlique pour le locus adénine-histidine. C.R. Acad. Sci. (Paris) 249 1412-1414 (1959).

Putrament A. On the mechanism of mitotic recombination in Aspergillus nidulans. 1. Intragenic recombination and DNA replication. Molec. Gen. Genetics 100 307-320 (1967).

Whiteley H.R. Induced synthesis of formyltetrahydrofolate synthetase in Microccus aerogenes. Arkiv für Mikrobiologie 59 315-323 (1967)

Wildenberg J. The relation of mitotic recombination to DNA replication in yeast pedigrees. Genetics 66 291-304 (1970).

CHAPITRE V.

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DE LA RECOMBINAISON MITOTIQUE.

Au stade zygotène et pachytène de la prophase méïotique, il apparait dans le noyau une structure caractéristique, le complexe synaptonématique. Le rôle de cette structure est encore inconnu, on la soupçonne de jouer un rôle dans la recombinaison, en favorisant l'appariement d'échange (Sotelo 1969). L'étude de ce problème au moyen de la recombinaison mitotique devrait être très fructueuse. Si ce complexe est indispensable pour que se réalise l'appariement des chromosomes, on doit l'observer aussi bien au cours de la recombinaison mitotique qu'au cours de la méïose. Par contre, s'il a une activité autre, plus spécifique de la méïose, on ne doit l'observer que dans des cellules en prophase méïotique.

La levure se prête, a priori, bien à cette étude puisqu'on sait provoquer l'appariement de tous les chromosomes dans une fraction importante (10%) d'une population de cellules en phase végétative (cf chapitre III.).

1. ETUDE DU COMPLEXE SYNAPTONEMATIQUE.

Technique.

Le complexe synaptonématique a été mis en évidence chez Saccharomyces cerevisiae par Engels et Croes (1968). La technique utilisée par ces auteurs est originale: après une double fixation glutaraldéhyde-acide osmique, ils traitent les cellules au permanganate de potassium. La qualité des images obtenues par cette technique n'étant pas très bonne, nous avons préféré utiliser la technique de Moens et Rapport (1971). Les cellules sont fixées dans du glutaraldéhyde à 3% dans du tampon phosphate pH 7,2 0,1M pendant 24 heures, puis post fixées à l'acide osmique à 2% dans le même tampon pendant une heure. Les cellules sont imprégnées d'Epon sans catalyseur pendant deux jours à 60°C, puis incluses dans de l'Epon avec catalyseur.

Résultats.

Nous avons fixé à l'aide de cette technique aussi bien des cellules en prophase de méïose que des cellules en phase végétative. La figure 1 montre des coupes de cellules en prophase de méïose (Stade 9 heures correspondant au pachytène). La chromatine est nettement visible, mais l'image observée est du type de celles que l'on obtient par une surfixation au glutaraldéhyde (membranes en contraste négatif, ribosomes mitochondriaux très nets).

Nous n'avons jamais observé de complexe synaptonématique au cours de la prophase méïotique, même en utilisant des techniques de coloration "spécifiques". (Sheridan et Barrnett 1969, Esponda et Stockert 1971).

D'autre part, il n'a jamais été possible d'obtenir une image en contraste normal en même temps qu'une bonne fixation. Nous avons essayé différents temps pour la fixation au glutaraldéhyde ou à l'acide osmique. Nous avons même traité directement des coupes déposées sur une grille d'or à l'acide osmique. Le léger progrès obtenu après 2 heures dans l'acide osmique à 2% froid (4°C) ne justifie pas le travail supplémentaire exigé par cette technique. Les modifications du pH du tampon n'ont donné, elles aussi, aucun résultat.

Comme nous n'avons pas pu mettre en évidence de complexe synaptonématique au cours de la méïose à l'aide de nos souches, notre travail n'a pas abouti. Cet échec peut avoir plusieurs origines, mais il nous semble probable qu'on peut l'imputer à la différence qui existe entre nos souches et celle utilisée par Engels et Croes (1968) et Moens et Rapport (197 Ces auteurs ont tous utilisé la même souche, isolée par Croes. C'est plus exactement un sous-clône issu de cette souche qui présente la caractéristique de permettre la mise en évidence d'un "poly complex body" (forme structurale rattachée au complexe synaptonématique) dans une proportion élevée des noyaux. Le complexe synaptonématique au sens strict n'est observé que rarement parmi ces cellules. (Moens et Rapport 1971).

Ce problème ne pourra être repris qu'après qu'un progrès certain ait

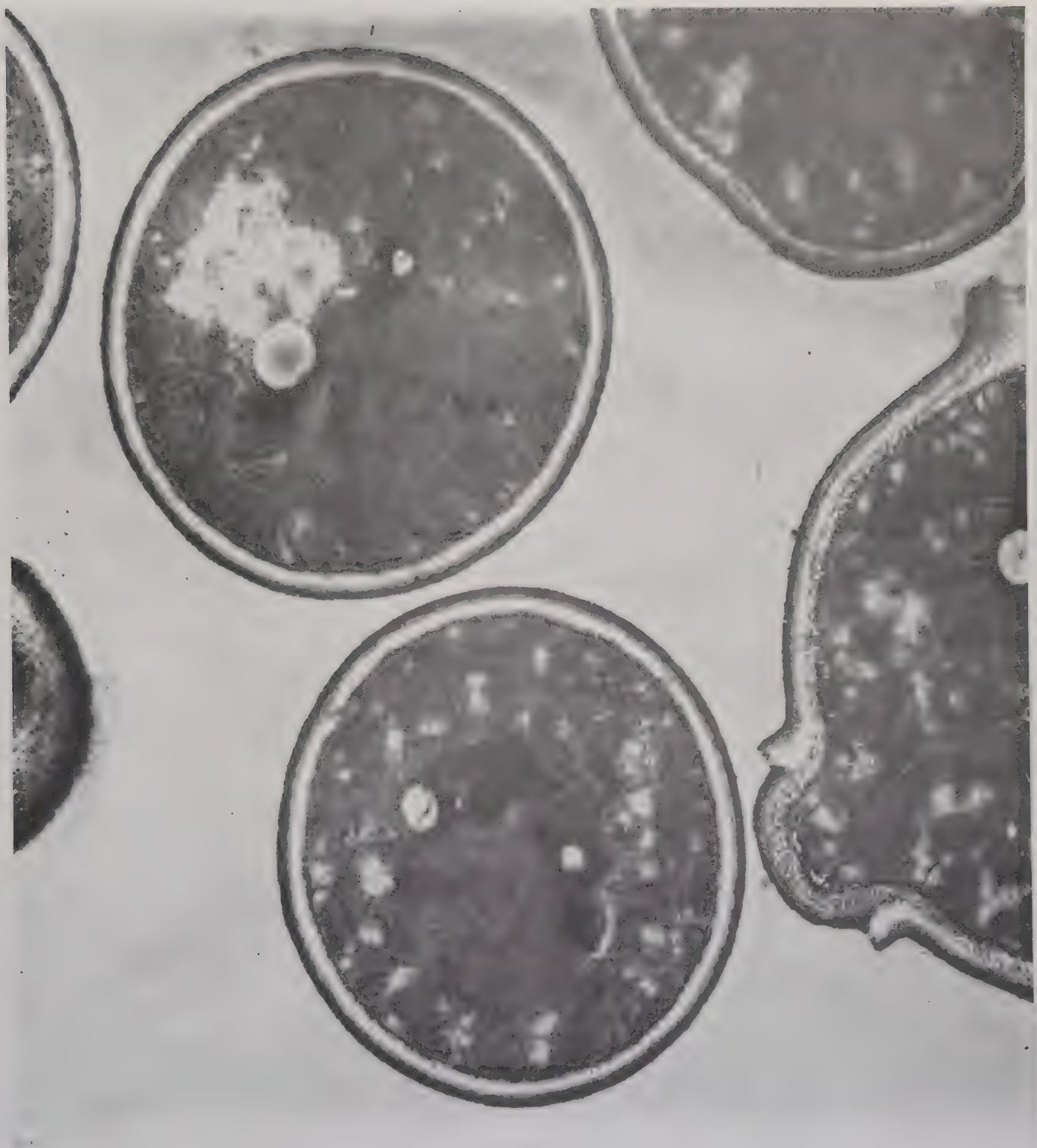
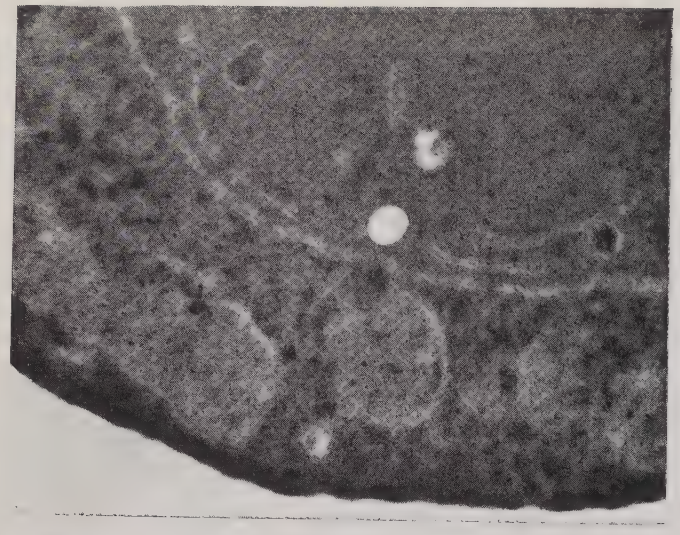
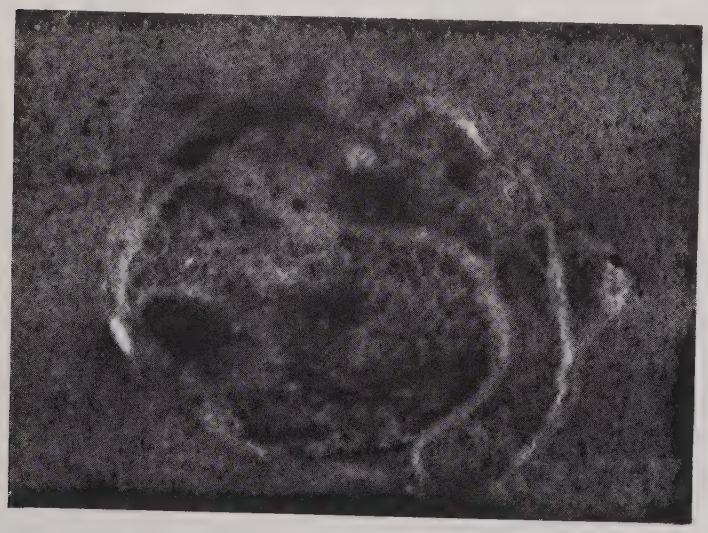


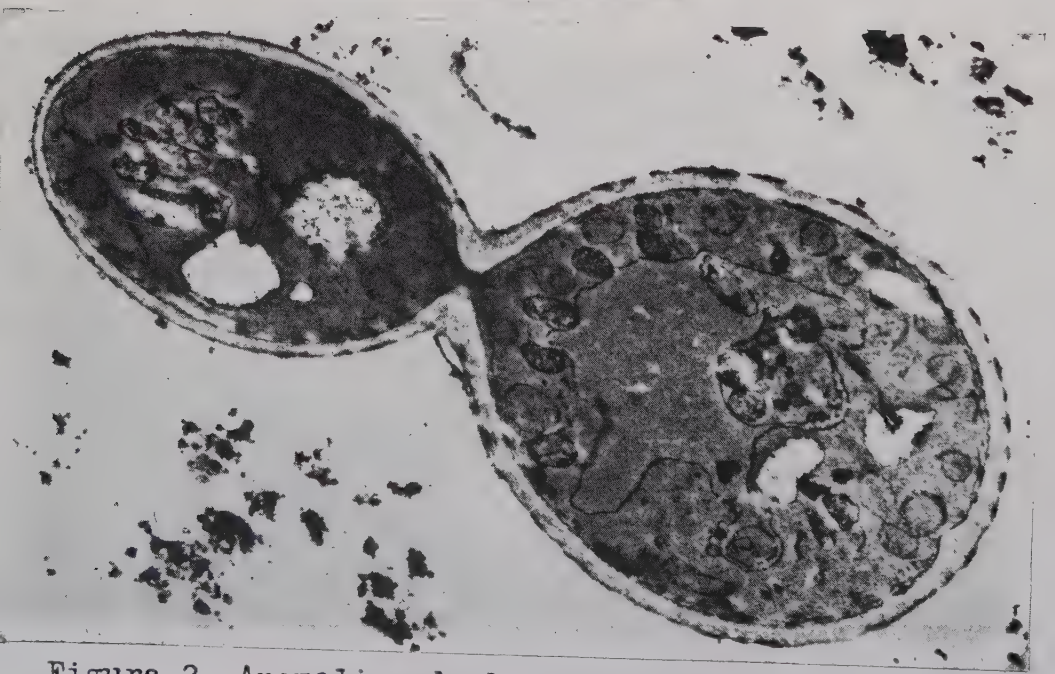
Figure 1. Cellules en prophase de méïose (9h en milieu de sporulation) Fixation glutaraldéhyde acide osmique x 28000.



"reduplicated membrane"
(Glutaraldéhyde acide osmique
x 50000)



Coupe tangentielle de la
membrane nucléaire
(Glutaraldéhyde acide osmique
x 50000)



Invagination de la
membrane nucléaire
(Permanganate de
sodium x 12000)

Figure 2. Anomalies de la membrane nucléaire associées à l'appariement d'échange pendant la phase végétative.

été accompli dans les techniques cytologiques appliquées à Saccharomyces cerevisiae.

2. ANOMALIES DE LA MEMBRANE NUCLEAIRE.

Au cours de l'étude du complexe synaptonématique, nous avons observé des anomalies de la membrane nucléaire dans les cellules ade3.3/ade3.6 cultivées en carence d'histidine. Nous avons étudié deux souches très distantes d'un point de vue généalogique (LM 27 qui a servi aux premiers travaux sur "l'effet histidine" et MA 173 que nous avons construit pour l'étude de la recombinaison dans une souche double hétéroallèlique). Nous avons retrouvé les mêmes phénomènes dans les deux souches.

Les anomalies observées sont de deux types (figure 2). D'une part, on observe des invaginations de la membrane nucléaire donnant une forme très découpée au noyau. Bien qu'on ne l'ait jamais signalé chez la levure, ce genre d'anomalie n'a rien de caractéristique et se rencontre quand il y a un métabolisme anormal (cellules cancéreuses par exemple Bernhard 1969). D'autre part, on observe une"reréplication" de la membrane nucléaire ("reduplicated membrane"). Une telle figure est beaucoup plus rare et n'a été signalée que dans le cas de la multiplication de certains virus (Adenovirus,Gregg et Morgan 1959 et surtout Herpes Simplex Virus,Nii Morgan et Rose 1968).

Le plus remarquable est que ces phénomènes ne se rencontrent ni au cours de la méïose, ni dans les cellules cultivées en présence d'histidine (même en carence d'isoleucine dans le cas de MA 173). Nous ignorons ce qui lie ces anomalies de la membrane nucléaire à l'appariement des chromosomes provoqué par la carence en histidine. Tout au plus suppose-t-on que la membrane joue un rôle important au cours de l'appariement (Comings et Okada 1970, Hecht et Stern 1971).

3.CONCLUSION.

Ce travail sur l'ultrastructure de la cellule au cours de la recombinaison mitotique mérite sûrement d'être poursuivi, surtout au niveau de l'étude des membranes nucléaires, pour laquelle les techniques sont très simples (permanganate de potassium) et sont applicables immédiatement.

Remerciements. Je remercie Monsieur Yotsuyanagi qui m'a guidé tout au long de ce travail. Je remercie aussi Madame Annie Cassant et Monsieur Claude Grandchamp qui m'ont familiarisé avec les techniques de la microscopie électronique.

BIBLIOGRAPHIE.

Bernhard W. Ultrastructure of the cancer cell in "Handbook of molecular cytology". Lima de Faria ed. 688-715 (1969).

Comings D.E. et Okada T.A. Mechanism of chromosome pairing during meiosis. Nature 227 451-456 (1970).

Engels F.M. et Croes A.F. The synaptinemal complex in yeast. Chromosoma 25 104-106 (1968).

Esponda P. et Stockert J.C. Localization of RNA in the synaptinemal complex. J. Ultrastruct. Res. 35 411-417 (1971).

Gregg M. et Morgan C. Reduplication of nuclear membranes in HeLa cells infected with adenovirus. J. Biophys. Biochem. Cytol. 6 539-540 (1959).

Hecht N.B. et Stern H.A late replicating DNA protein complex from cells in meiotic prophase. Exptl. Cell Res. 69 1-10 (1971).

Moens P.B. et Rapport E. Synaptic structures in the nuclei of sporulating yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Sci. 9 665-677 (1971).

Nii S., Morgan C. et Rose H.M. Electron microscopy of Herpex Simplex Virus. 11. Sequence of developpment. J. Virology 2 517-536 (1968).

Sheridan W.P. et Barrnett R.J. Cytochemical studies on chromosome ultrastructure. J. Ultrastruct. Res. 27 216-229 (1969).

Sotelo J.R. Ultrastructure of the chromosomeat meiosis in "Handbook of molecular cytology". Lima de Faria ed. 413-434 (1969).

CHAPITRE VI.

ANALYSE FORMELLE DE LA RECOMBINAISON MITOTIQUE SPONTANEE.

Ce chapitre fera l'objet d'une publication dans Molec. Gen. Genetics.

Hénaut A. et Hénaut M.

Spontaneous mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae.

INTRODUCTION.

La recombinaison mitotique spontanée a été peu étudiée chez Saccharomyces cerevisiae et les concepts qu'on lui applique sont ceux élaborés pour la recombinaison mitotique induite par les UV ou les rayons X.

L'idée principale est celle de la "paraméïose" (Hurst et Fogel 1964). Cette hypothèse suppose que la recombinaison mitotique se produit par un mécanisme identique à une prophase de méïose et seule la division des centromères distinguerait les deux phénomènes. Cette hypothèse rend compte des recombinaisons gène-centromère induites par les UV ou les rayons X (Nakaï et Mortimer 1969), mais elle ne peut pas s'appliquer telle quelle à la recombinaison spontanée (chapitre III). Les modifications que nous avions alors proposées demandent une vérification expérimentale.

D'autre part, la recombinaison intragénique mitotique a surtout été étudiée après induction par les UV ou les rayons X et très peu de choses sont connues sur la recombinaison intragénique mitotique spontanée.

Pour ces raisons, nous avons repris le problème en utilisant les facilités qu'offre le "système ade3". Dans une culture d'une souche hétéroallèlique pour le gène ade3 (auxotrophe pour l'adénine et l'histidine), la carence en histidine pendant la phase végétative provoque une augmentation par un facteur 30 de la fréquence des cellules aptes à recombiner sans affecter la fréquence des recombinaisons parmi celles-ci (chapitre III). Une telle carence provoque donc une augmentation considérable de la fréquence des clônes recombinés et ceux-ci sont indépendants. Leur sélection est encore facilitée si on s'intéresse aux clônes prototrophes issus d'une cellule ayant subi une recombinaison au locus ade3.

Les résultats obtenus par cette technique nous ont conduit à revoir l'ensemble des hypothèses que l'on faisait sur la recombinaison mitotique. Nous avons alors tenté de donner une vue synthétique de la recombinaison mitotique spontanée en nous aidant aussi bien de nos résultats que de

ceux d'autres auteurs.

MATERIEL ET METHODES

Les difficultés techniques que présente l'étude de la recombinaison mitotique spontanée sont de deux types.

1.- Le génotype des clônes issus de recombinaison mitotique ne peut être connu que par l'analyse de tétrades, la classe ditype majoritaire indiquant la distribution des marqueurs liés dans la cellule recombinée originelle.

2.- Il est difficile de s'assurer de l'origine indépendante des divers clônes étudiés. Cette difficulté a été tournée de différentes façons suivant les auteurs. Kakar (1963) étale une culture de cellules hétéroalléliques pour le gène isol (auxotrophes pour l'isoleucine) sur un milieu non sélectif afin d'obtenir de nombreux clônes indépendants. Il teste ensuite l'apparition des prototrophes en restriant ces colonies sur un milieu sans isoleucine. La grande fréquence des clônes contenant des cellules prototrophes pour l'isoleucine (10 à 15%) lui garantit l'origine indépendante de celles-ci. Johnston (1971) utilise une souche homozygote pour la mutation ade2 (adénine exigeant et rouge) et hétérozygote pour le gène ade8 , donc de phénotype rouge. Tous les mécanismes qui conduisent à l'homozygotie pour la mutation du gène ade8 entraîneront en même temps la perte de la pigmentation rouge (Roman 1956a). Si cet évènement a lieu au cours de la première division de la cellule qui est à l'origine d'un clône, celui-ci paraitra sectoré, formé pour moitié de cellules blanches et pour moitié de cellules rouges. Les cellules blanches récupérées dans diverses colonies sectorées ont donc très probablement une origine indépendante.

Notre système de sélection des clônes indépendants, basé sur les propriétés du gène ade3, présente les avantages du crible positif comme celui de Kakar, avec un travail moindre. Il permet de plus de récupérer l'intégralité du clône issu de la cellule ayant recombinée, comme celui de Johnston.

TABLEAU 1

Type d'asques	Couple		
	adel-trp5	adel-leul	trp5-leul
T 11 P	256	359	1637
T 11 R	241	332	7
T 1V	312	102	628
Σ	809	793	2272

T 11 P = tétrade ditype parental

T 11 R = tétrade ditype recombiné

T 1V = tétrade tétratype

Les gènes ade3, met2, ura2 sont indépendants des centromères, indépendants entre eux et indépendants des autres gènes utilisés.

Mutants et souches.

Les mutants utilisés sont les suivants: ade3.3 et ade3.6 (adénine$^-$ et histidine$^-$) de Roman; ura2.30 (uracile$^-$) de Lacroute; adel (adénine$^-$ rouge), trp5 (tryptophane$^-$), leul (leucine$^-$), met2 (méthionine$^-$) de Hawthorne. Le diploïde utilisé dans cette étude a le génotype suivant:

$$\bullet\ \frac{adel}{+}\ \frac{trp5}{+}\ \frac{leul}{+}\ \bullet\ //\ \frac{ade3.3}{ade3.6}\ \frac{met2}{+}\ \frac{+}{ura2}\ \frac{\alpha}{a}$$

Les relations entre les marqueurs ne diffèrent pas de celles rapportées par Mortimer et Hawthorne (1966) (tableau 1).

Techniques.

La composition des milieux de culture est décrite dans les articles précédents (Luzzati, Clavilier, Péré-Aubert, Slonimski 1971).

Une culture d'une nuit en milieu naturel liquide est étalée sur des boîtes de milieu minimum (Yeast nitrogen base without aminoacid Difco) supplémenté en uracile (20 μg/ml), L.leucine (60 μg/ml), L.méthionine (10 μg/ml),L.tryptophane (20 μg/ml) à une concentration de 2 10^5 cellules par boîte. Les colonies ade3$^+$ (prototrophes pour l'adénine et l'histidine) apparaissent dès le deuxième jour. Elles proviennent de cellules prototrophes préexistantes et de cellules ayant recombiné sur la boîte. Après un accroissement important dû à la carence en histidine, le nombre des colonies ade3$^+$ atteint un plateau le cinquième jour qui suit l'étalement. Les colonies apparues entre le deuxième et le cinquième jour proviennent très probablement de cellules ayant recombiné sur la boîte, et sont donc indépendantes (Luzzati et al, 1971). Ce sont celles-ci qui sont restriées sur le même milieu en vue d'une étude ultérieure. L'auxotrophie pour un des suppléments sus indiqués est alors déterminée par réplique. Le génotype de ces clônes est établi par l'analyse, en moyenne de seize tétrades complètes.

RESULTATS

1. La recombinaison intergénique.

Le modèle le plus achevé qui rende compte de la recombinaison mitotique chez la levure est celui de la "paraméïose" de Hurst et Fogel (1964). Selon ce modèle, la recombinaison mitotique se produirait selon un mécanisme identique à la méïose, à la disjonction des centromères près.

Dans une étude précédente (chapitre III), nous avons pu montrer que, en effet, la fréquence de recombinaison intragénique méïotique n'est pas différente de la fréquence de recombinaison intragénique mitotique si cette dernière est calculée parmi les cellules aptes à recombiner. Par contre, il ne semble pas qu'il en soit de même pour la recombinaison gène-centromère quand la fréquence de cet évènement est estimée par la fréquence d'homozygotie de l'allèle récessif. Cette contradiction entre la théorie et les résultats expérimentaux peut n'être qu'apparente et liée à la technique utilisée pour mesurer la fréquence de recombinaison gène-centromère. Par exemple, si la répartition des chromatides dans les noyaux fils ne se fait pas au hasard et que celles qui ont subi un crossing-over restent associées, les cellules filles auront un phénotype parental.

Il est donc indispensable de mesurer directement la fréquence des crossing-over dans une région donnée.

Si une région est délimitée par deux marqueurs liés, il est possible de mettre en évidence un remaniement des chromatides, même s'il n'entraîne pas un nouveau phénotype. L'analyse en tétrades d'un clône permet d'établir le génotype de la cellule originelle, et, pour deux marqueurs liés, leur disposition réciproque, celle-ci correspondant à la catégorie ditype majoritaire. Ainsi, un crossing-over entre deux gènes dans une cellule sera automatiquement mis en évidence par un changement de la catégorie ditype majoritaire dans les tétrades issues de sa descendance.

Pratiquement, il faut utiliser un couple de marqueurs suffisament liés pour que la détermination de la classe ditype majoritaire ne soit pas ambigüe.

La mesure de la fréquence de recombinaison dans une région donnée suppose donc de déterminer le génotype d'un certain nombre de clônes dont la cellule originelle était apte à recombiner. Nous avons étudié l'intervalle leu1 trp5 (longueur 15 centimorgan) dans des clônes $ade3^+$. Ces clônes, qui sont issus de cellules ayant subi une recombinaison au locus ade3, dérivent de cellules aptes à recombiner.

Nous avons obtenu les résultats suivants:

Sur 193 clônes $ade3^+$ restés hétérozygotes pour leu1 et trp5, aucun ne montra une disposition recombinée pour ces deux marqueurs alors que le modèle de la "paraméïose" prédit qu'au minimum 15% des clônes auraient dû subir une recombinaison dans cette région.

Ce résultat prouve que si le crossing-over existe au cours de la recombinaison mitotique spontanée, c'est un évènement exceptionnel.

2. La conversion.

L'étude du mécanisme qui entraîne l'homozygotie au cours de la recombinaison mitotique spontanée peut se faire de deux façons:-1)Soit en analysant des colonies prises au hasard dans la population de clônes $ade3^+$. -2) Soit en n'analysant que des clônes devenus homozygotes pour un des allèles récessifs du diploïde utilisé.

Dans une première série d'expériences, nous avons établi le génotype de 128 clônes $ade3^+$ pris au hasard. Sur ces 128 clônes, un était homozygote $\frac{ura2^+}{ura2^+}$, un était $\frac{met2^+}{met2^+}$, un était $\frac{ura2^+}{ura2^+}\,\frac{met2^+}{met2^+}$, un était $\frac{\alpha}{\alpha}$. De plus , un clône était composé de deux types de cellules en proportions égales: des cellules $\frac{met2}{met2}$ et des cellules $\frac{met2}{met2^+}$. Ainsi que le confirme une deuxième série d'expériences (voir plus loin), il est extrêmement probable que ce clône mixte dérive d'une seule cellule et non pas d'un mélange de deux clônes.Il est impossible d'expliquer les clônes mixtes

TABLEAU 2

Génotype	Effectif
$\frac{leu1\ trp5}{+\ +}\ \frac{+}{ura2}\ \frac{met2}{+}$	génotype original
$\frac{leu1\ trp5}{+\ +}\ \frac{+}{ura2}\ \frac{met2}{met2}$	37
$\frac{leu1\ trp5}{leu1\ +}\ \frac{+}{ura2}\ \frac{met2}{met2}$	1
$\frac{leu1\ trp5}{+\ +}\ \frac{ura2}{ura2}\ \frac{met2}{+}$	25
$\frac{leu1\ trp5}{+\ +}\ \frac{ura2}{ura2}\ \frac{met2}{met2}$ $\frac{leu1\ trp5}{+\ +}\ \frac{ura2}{ura2}\ \frac{met2}{+}$	1
$\frac{leu1\ trp5}{+\ +}\ \frac{ura2}{ura2}\ \frac{met2}{+}$ $\frac{leu1\ trp5}{+\ +}\ \frac{+}{+}\ \frac{met2}{+}$	2 *
$\frac{leu1\ trp5}{leu1\ +}\ \frac{+}{ura2}\ \frac{met2}{+}$	5
$\frac{leu1\ +}{leu1\ +}\ \frac{+}{ura2}\ \frac{met2}{+}$	2
$\frac{leu1\ trp5}{+\ trp5}\ \frac{+}{ura2}\ \frac{met2}{+}$	2

Génotype des clônes ade3^{+}. Sur 8324 clônes ade3^{+} testés, 82 étaient auxotrophes pour au moins un des suppléments. 75 ont pu être analysés en tétrades et leur génotype est donné dans ce tableau.

* Ces deux clônes ont pu être sélectionnés grâce à l'aspect sectoré de leur réplique.

par un mécanisme du type crossing-over. D'autre part, ces résultats montrent que dans une même cellule, des recombinaisons spontanées peuvent avoir lieu sur plusieurs chromosomes en même temps. Ceci était prouvé dans le cas de la recombinaison induite par les U.V. (Wilkie et Lewis 1963) et était supposé vrai pour les autres types de recombinaison mitotique chez Saccharomyces cerevisiae.

La faible fréquence des évènements étudiés limite les possibilités de ce type d'expérience, aussi cette étude a-t-elle été continuée en utilisant une autre méthode.

Les colonies ade3$^+$ sont striées sur du milieu synthétique complet sans adénine et sans histidine, leur phénotype étant ensuite déterminé par répliques. Le génotype des clônes auxotrophes est alors établi par l'analyse en tétrades. Par cette technique, il est impossible de tester toutes les colonies ade3$^+$, certaines étant trop petites pour être repiquées. D'autre part, les clônes formés de cellules prototrophes et de cellules auxotrophes seront comptés comme prototrophes. Il n'est donc pas possible de mesurer de cette façon la fréquence vraie d'homozygotie pour l'allèle récessif des différents gènes étudiés.

Les résultats de cette deuxième série d'expériences sont donnés dans le tableau 2.

Il faut tout d'abord remarquer que la fréquence obsorvée d'homozygotie pour un allèle récessif est plus faible que la fréquence d'homozygotie pour l'allèle dominant correspondant: la fréquence des clônes ade3$^+\frac{ura2^+}{ura2^+}$ est de 2/128 et la fréquence des clônes ade3$^+\frac{ura2}{ura2}$ de 26/8324. Il est vraisemblable que cette différence est due à un biais expérimental, les clônes auxotrophes étant contresélectionnés. En effet, si la fréquence des clônes ade3$^+$ auxotrophes pour l'uracile est estimée en faisant les répliques à partir des boîtes sur lesquelles sont apparus les clônes recombinés (chapitre III), on obtient une valeur de 3%, qui n'est pas fifférente de la fréquence d'homozygotie pour l'allèle dominant estimée en établissant le génotype de clônes ade3$^+$ pris au hasard.

Tableau 3

Génotype des clônes (ade3$^+$)

	ade3.6/+	ade3.3/+	+/+	ade3.6/+ +/+	ade3.6/+ ade3.3/+	Σ
1° série	80	37	I0	1	0	I28
2° série	36	9	24	5	1	75
dont						
met$^-$	20	6	I0	1	0	37
ura$^-$	I0	3	I2	2	1	28
leu$^-$	5	0	1	2	0	8
trp$^-$	1	0	1	0	0	2

Comme dans la première série d'expériences, une des colonies ade3$^+$ analysée est mixte pour le gène met2. Mais ici, cette colonie est de plus auxotrophe pour l'uracile. Il est donc invraisemblable qu'elle dérive d'un mélange de deux clônes. Par contre, si la conversion a lieu au cours de la phase G1, le clône ade3$^+$ est composé de la totalité de la descendance et il a le génotype attendu si la cellule initiale a subi une conversion totale au locus ura2 et une demi-conversion au locus met2.

L'absence de crossing over dans la région leu1-trp5 établie dans le paragraphe précédent, est confirmée par l'analyse des clônes ade3$^+$ auxotrophes pour la leucine. Aucun ne peut s'expliquer simplement en terme de crossing over. Par contre, on observe une nette interférence négative entre les conversions aux loci leu1 et trp5.

3. La recombinaison intragénique.

Les génotypes, des clônes ade3$^+$ de la première série d'expériences (clônes pris au hasard) et de la deuxième série d'expériences (clônes auxotrophes) sont résumés dans le tableau 3.

L'inégalité entre les effectifs des catégories ade3.6/ade3$^+$ et ade3.3/ade3$^+$ traduit une polarité de la recombinaison. Cette polarité peut n'être qu'apparente et due à des taux de conversion différents pour les deux allèles. Il exixte en plus trois catégories de génotypes inattendus: les clônes ade3$^+$/ade3$^+$, les clônes ade3.6/ade3$^+$, ade3$^+$/ade3$^+$ et le clône ade3.6/ade3$^+$, ade3.3/ade3$^+$.

Origine des clônes ade3$^+$/ade3$^+$. Si la cellule qui est à l'origine d'un tel clône est en phase G2 (stade 4 chromatides), son génôme comporte deux allèles ade3.3 et deux allèles ade3.6. Après une conversion simultanée d'un ade3.3 et d'un ade3.6 en ade3$^+$, le gène ade3 est représenté par deux allèles ade3$^+$, un allèle ade3.3 et un allèle ade3.6. Suivant la distribution des chromatides au cours de la mitose, les deux cellules filles ont,soit l'une le génotype ade3$^+$/ade3$^+$ et l'autre le génotype ade3.3/ade3.6, soit l'une le génotype ade3.3/ade3$^+$, et l'autre le

génotype ade3.6/ade3$^+$. Chaque cas étant également probable , cette hypothèse prédit une fréquence égale de clônes ade3$^+$/ade3$^+$ et de clônes mixtes ade3.3/ade3$^+$, ade3.6/ade3$^+$. Ceci ne correspond pas aux résultats expérimentaux (34clônes ade3$^+$/ade3$^+$ contre un clône mixte ade3.3/ade3$^+$, ade3.6/ade3$^+$, pour l'ensemble des deux expériences.)

Il est tentant de rechercher une solution unique au problème que pose la forte fréquence des clônes ade3$^+$/ade3$^+$ par rapport à la faible fréquence des clônes ade3.3/ade3$^+$, ade3.6/ade3$^+$ et au problème de l'origine des clônes mixtes met2/met2,met2/met2$^+$, qui ne peut être attribué à un crossing over. Deux hypothèses seulement rendent compte de l'ensemble des résultats.

L'existence d'un clône ade3.3/ade3$^+$, ade3.6/ade3$^+$ démontre la possibilité de doubles conversions. Si un tel évènement se produit au cours de la phase G1, il peut conduire après la mitose à deux cellules filles de génotype ade3$^+$/ade3$^+$. Cette hypothèse ne prédit aucune corrélation entre la fréquence des clônes mixtes ade3.3/ade3$^+$, ade3.6/ade3$^+$ et celle des clônes ade3$^+$/ade3$^+$. Les recombinaisons au locus ade3 qui se produisent au cours de la phase G1 permettent, en général, de sélectionner l'ensemble de la descendance de la cellule dans laquelle s'est produit la recombinaison. Ceci offre une explication simple pour les clônes mixtes met2/met2, met2/met2$^+$. L'énoncé de la première hypothèse est le suivant:"La recombinaison mitotique spontanée peut se produire au cours de la phase G1. Dans ce cas, il est possible de sélectionner la totalité de la descendance de la cellule dans laquelle s'est produit la recombinaison."

L'hypothèse alternative est la suivante :"Tous les évènements se produisent au cours de la phase G2, mais la ségrégation des chromatides, au cours de la mitose ne se fait pas au hasard, Les chromatides ayant subi l'évènement de conversion restent associées, et elles ségrègent ensemble dans la même cellule fille."

Les deux hypothèses sont formellement semblables puisque dans la première (phase G1) il n'existe que deux chromatides et que dans la seconde

	Génotype au moment de la recombinaison	Ségrégation			
		a 4+:4- b 4+:4-	a 6+:2- b 4+:4-	a 6+:2- b 5+:3-	a 6+:2- b 6+:2-
Méïose	$\frac{a \quad +}{a \quad +}$ / $\frac{+ \quad b}{+ \quad b}$	a+ a+ a+ a+ +b +b +b +b	a+ a+ ++ ++ +b +b +b +b	a+ a+ ++ ++ ++ ++ +b +b	a+ a+ ++ ++ ++ ++ +b +b
Mitose	$\frac{a \quad +}{+ \quad b}$	a+ +b a+ +b	++ +b ++ +b	++ +b ++ ++	++ ++ ++ ++

Figure 1.

Analogie entre la descendance d'une cellule ayant subi une conversion pendant la phase G1 et les spores d'une octade issues d'une méïose au cours de laquelle se serait produit la même conversion.

les deux chromatides qui ont participé à l'évènement de recombinaison ségrègent ensemble et constituent les chromatides de la phase G1 d'une des cellules filles. L'autre, qui reste de génotype parental, est perdue

Dans les deux hypothèses, il y a une analogie entre la descendance d'une cellule ayant subi une recombinaison mitotique et les produits de la méïose d'un organisme à octades du type Ascobolus (figure 1). Une paire de chromosomes d'une cellule en phase G1 est équivalente aux deux chromatides qui participent à la recombinaison au cours de la méïose. Il est donc légitime d'utiliser le vocabulaire classique de l'analyse de tétrades pour décrire les ségrégations mitotiques, et on peut écrire que les clônes $ade3^+/ade3^+$ dérivent d'une conversion 6+:2- pour l'allèle ade3.3 et pour l'allèle ade3.6.

Origine des autres types de clônes. Les clônes mixtes ade3.6/$ade3^+$, $ade3^+/ade3^+$ ont pour origine une conversion 6+:2- de l'allèle ade3.3 et 5+:3- de l'allèle ade3.6. Le clône mixte ade3.6/$ade3^+$, ade3.3/$ade3^+$ résulte d'une conversion 5+:3- aux deux sites. Les clônes ade3.6/$ade3^+$ dérivent soit d'une conversion 6+:2- soit d'une conversion 5+:3- pour l'allèle ade3.3, l'allèle ade3.6 ne participe pas à la conversion. Pour expliquer les clônes ade3.3/$ade3^+$, il suffit d'inverser le rôle des allèles.

Notre interprétation pour l'origine des différents types de clônes est valable dans les deux hypothèses. Dans la deuxième hypothèse, tous les évènements sont simplement retardés d'une génération par rapport aux évènements correspondant dans la première hypothèse.

Conversion aux autres loci. Dans la deuxième hypothèse (G2), les crossing over ne peuvent jamais conduire à l'homozygotie pour un allèle donné, à moins de supposer que les chromatides remaniées à la suite d'un crossing over ne restent pas associées, comme c'est le cas lorsqu'elles ont subi une conversion. Cette restriction parait peu justifiable.

Dans la première hypothèse (une partie des recombinaisons se produit en G1), l'homozygotie peut être la conséquence d'un crossing over. La probabilité d'un tel évènement est cependant faible. En effet, la fréquenc

des crossing over mitotique n'est égale ,au maximum, qu'au dixième de la fréquence des crossing over au cours de la recombinaison méïotique (analyse du segment leul trp5, paragraphe 1).

Dans tous les cas, les clônes auxotrophes que nous avons sélectionnés peuvent être facilement expliqués en terme de conversion. Il est clair que les clônes mixtes met2/met2, met2/met2$^+$ résultent d'une conversion 5-:3+ en G1 ou en G2. Les deux clônes mixtes ura2/ura2, ura2$^+$/ura2$^+$ peuvent résulter d'un 4+:4- aberrant ("post meiotic 4+:4m^p de Emerson 1969).

4. Recombinaison en phase G1

Au cours de l'analyse de la recombinaison intragénique, nous avons proposé deux hypothèses quant au stade où se produit la recombinaison mitotique. Il existe des arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle une partie des recombinaisons se produirait pendant la phase G1.

Il existe une différence significative pour la fréquence des clônes ade3$^+$/ade3$^+$ et ade3+/ade3+, ade3.6/ade3$^+$ entre les deux expériences (tableau 3). Ceci n'est pas explicable si tous les évènements de recombinaison se produisent au cours de la phase G2. Par contre, c'est le résultat attendu si la population des clônes ade3$^+$ est composée d'un mélange de clônes issus soit d'une recombinaison en phase G1, soit d'une recombinaison en phase G2. En effet, des conversions 6-:2+ à un locus donné conduisent toujours à un clône auxotrophe si elles ont lieu en G1, alors que les mêmes évènements en G2 n'entraînent l'auxotrophie du clône ade3$^+$ qu'une fois sur deux. La sélection de clônes ade3$^+$ auxotrophes pour un autre produit doit donc enrichir l'échantillon étudié en évènements qui se sont produits au cours de la phase G1. C'est précisément ce que nous observons.

Un deuxième argument en faveur de l'existence d'une recombinaison au cours de la phase G1 est apporté par l'étude de la recombinaison mitotique induite par les rayons X. Wildenberg (1970) a montré en faisant des

pédigrés que certaines recombinaisons avaient lieu au cours de la phase G1.

5. Résumé.

Les points saillants sont

1) La rareté des crossing over.

2) L'existence d'évènements de conversion pendant la phase G1

3) L'existence de doubles conversions au cours de la recombinaison intragénique au locus ade3.

DISCUSSION.

Les travaux les plus anciens (jusqu'en 1958 inclus) ont été faits sans prendre de précautions spéciales pour s'assurer de l'origine indépendante des clônes étudiés. Leur valeur est confirmée par le fait qu'on retrouve les mêmes phénomènes dans des études ultérieures basées sur l'analyse de clônes indépendants. Nous les utiliseront donc au même titre que les travaux récents et que nos propres résultats pour tenter de caractériser la recombinaison mitotique spontanée.

CARACTERISTIQUES DE LA RECOMBINAISON MITOTIQUE SPONTANEE.

1. La recombinaison intragénique.

Doubles conversions. Quelque soit le gène étudié, une partie des colonies de phénotype sauvage est formée de clônes homozygotes +/+. La fréquence de ce type de clônes varie suivant les couples d'allèles: 6/119 pour ade6.1xade6.2 (Roman 1956b, 1958), 5/59 pour isol.a x isol.b (Roman et Jacob 1958). En utilisant ces deux derniers allèles, Kakar (1963) trouve une fréquence inférieure de clônes $isol^+/isol^+$ (1/69), mais son étude est basée sur un système de sélection qui lui assure que les clônes sont indépendants (cf. Matériel et méthodes). Pour le couple ade3.3 x ade3.6 suivant le type d'expérience, nous avons trouvé une fréquence de 10/128 ou de 24/ 75. Dans aucun de ces travaux, il n'a pu être mis en évidence de recombinaison intragénique réciproque (clône du type ab/++). L'étude du couple ade3.3 x ade3.6 a permis de plus, de mettre en évidence des ségrégations équivalentes aux ségrégations post-méïotiques (5+:3-).

Cet ensemble de résultats est favorable à l'interprétation suivante: La recombinaison intragénique résulte d'échanges non réciproques, elle peut donner lieu à des doubles conversions.

Double conversion et coconversion. Actuellement, on ne peut comparer fréquence de double conversion et distance entre les sites que dans deux cas: -celui de isol.a x isol.b (distance méïotique 20 prototrophes/10^3 asques. Sherman et Roman 1963. distance en nucléotides: 1400 nucléotides. Thuriaux, Minet, ten Berge et Zimmerman 1971) et celui d'ade3.3 x ade3.6 (distance méïotique 3 prototrophes /10^3 asques. cf chapitre III). Cette comparaison suggère que la fréquence des doubles conversions décroit lorsque la distance qui sépare les deux sites augmente.

La conversion simultanée 6+:2- de deux allèles placés en position trans, qui conduit à des clônes +/+, est caractéristique de la recombinaison mitotique. Nous appelons cet évènement double conversion.

Un évènement semblable au cours de la méïose conduirait à des tétrades contenant deux spores prototrophes. En étudiant la recombinaison intragénique au locus hisl, Fogel et Hurst (1967) ont trouvé 834 asques contenant une spore prototrophe et aucun asque en présentant deux.

D'autre part, toutes les conversions simultanées observées au cours de la méïose dans le gène arg4 (Fogel et Mortimer 1969) sont sans exception des "coconversions", c'est-à-dire que si un des allèles a subi une conversion 6+:2-, l'autre allèle, lorsqu'il est en position trans, fait une conversion 6-:2+. La fréquence de ces coconversions décroit elle aussi lorsque la distance entre les deux sites augmente.

Double conversion et recombinaison en phase G1. Une double conversion au stade 4 chromatides conduit avec une chance égale soit à un clône +/+, soit à un clône mixte a+/++,+b/++. Par contre, si la recombinaison a lieu au cours de la phase G1, on observe surtout des clônes +/+, les clônes mixtes correspondant alors à des ségrégations 5+:3-. Nos résultats expérimentaux montrent qu'il existe une très grande disproportion entre la fréquence des clônes +/+ et la fréquence des clônes mixtes. Une partie au moins de la recombinaison mitotique spontanée doit donc avoir lieu pendant la phase G1.

TABLEAU 4.

Mutant	Chromosome	Distance gène-centromère cM	Fréquence d'homozygotie	Référence
ura3	V	5	0,002 $\frac{4}{2053}$	Kakar (1963)
his1	V	35	0,007 $\frac{18}{2471}$	
arg6	V	37	0,002 $\frac{4}{1945}$	
trp2 *	V	59	0,052 $\frac{142}{2471}$	
leu1	VII	3	0,001 $\frac{9}{8324}$	Cet article
trp5	VII	18	0,0002 $\frac{2}{8324}$	

La distance gène centromère est en centiMorgan.

* trp2 est distal par rapport au gène isol à l'intérieur duquel s'est produit une recombinaison.

2. Mécanismes conduisant à l'homozygotie.

Au cours de la recombinaison mitotique, des gènes qui sont à l'état hétérozygote dans le diploïde d'origine, deviennent homozygotes. Divers mécanismes permettent d'expliquer ce phénomène.

Accidents chromosomiques. Dans cette étude, sur 215 clônes ade3$^+$ analysés, 10 ne sporulaient pas, ou sporulaient mal. Dans deux clônes, la viabilité des spores laissaient supposer un accident chromosomique. Johnston (1971) a trouvé une fréquence d'haploïdisation spontanée de $5\ 10^{-5}$ par génération.

Crossing over. La fréquence des crossing over dans les cellules aptes à recombiner est plus faible au cours de la phase végétative qu'en méïose. Nous n'avons pas trouvé de clônes recombinés dans la région leu1 trp5 (longueur 15 centiMorgan) parmi les clônes étudiés. Les crossing over mitotiques existent cependant, et ils sont associés à la recombinaison intragénique. Kakar (1963) trouve 12 clônes recombinés dans la région his1-iso1 (longueur 15 centiMorgan) parmi les 68 clônes iso1$^+$ étudiés. Mais ces 68 clônes ne forment pas un échantillon représentatif de la population. Après correction, la proportion de clônes recombinés est de 11%.

Conversion. Ce mécanisme peut provoquer l'homozygotie aussi bien en phase G1 qu'au stade 4 chromatides. Il ne prévoit pas de proportionnalité entre la distance gène centromère et la fréquence d'homozygotie. Cette absence de proportionnalité est montrée par le tableau 4. D'une façon plus directe, nous avons montré que certains clônes homozygotes dérivent d'une conversion au stade deux chromatides.

Une conversion à un site augmente la probabilité qu'il y ait une autre conversion à un locus faiblement lié (interférence négative):
Nous avons trouvé deux clônes trp5$^+$/trp5+ parmi les 9 clônes leu1/leu1

(distance 15 centiMorgan). Johnston (1971) trouve 5 doubles conversions ade8 et trp4 parmi les 18 clônes ade8 qu'il analyse (distance 30 cM).

Résumé. Chez Saccharomyces cerevisiae, l'homozygotie est le plus souvent la conséquence d'une conversion survenue au stade deux ou au stade quatre chromatides. Elle peut aussi provenir d'un crossing over au stade quatre chromatides, ce mécanisme étant cependant rare.

LES MODELES.

La recombinaison intragénique mitotique se caractérise par l'aspect exceptionnel des crossing over et par l'existence de doubles conversions. Il est intéressant de voir dans quelle mesure les différents modèles de recombinaison permettaient de prévoir ces phénomènes.

1. Implications du phénomène de double conversion.

Tous les résultats expérimentaux sont favorables à l'idée que le mécanisme de la conversion met en jeu un fragment d'ADN d'une certaine longueur. Quand deux sites sont inclus dans ce fragment d'ADN, ils convertissent simultanément dans le même sens (coconversion).

D'autre part, la relation fréquence de recombinaison distance entre les sites n'est linéaire que pour les faibles distances. Ensuite, la fréquence de recombinaison croit plus vite que la distance (expansion de la carte). Au cours de la recombinaison méïotique chez Saccharomyces cerevisiae, l'expansion de la carte apparait à partir d'une distance de 6 prototrophes pour 10^3 asques (ade8 Esposito 1968, ade3 Jones 1972). Cette expansion de la carte s'observerait quand la distance entre les sites est assez grande pour être voisine de la longueur du fragment d'ADN mis en jeu au cours de la conversion.

Enfin, les doubles conversions ne sont possible que quand la distance entre les sites est supérieure à la longueur du fragment d'ADN qui intervient au cours d'une conversion.

La distance ade3.3 ade3.6 est inférieure à la longueur du fragment d'ADN mis en jeu au cours de la recombinaison méïotique. En effet, cette distance est de 3 prototrophes/10^3 asques (chapitre III) alors que l'expansion de la carte ne commence que pour des distances de l'ordre de 6 prototrophes/10^3 asques (Jones 1972).

Par contre, la distance ade3.3 ade3.6 est supérieure à la longueur du fragment d'ADN mis en jeu au cours d'une conversion pendant la recombinaison mitotique, puisqu'il y a des doubles conversions.

La distance entre les deux sites étant évidement constante, ceci montre que le fragment d'ADN qui participe à une conversion est plus petit au cours de la recombinaison mitotique qu'au cours de la recombinaison méïotique.

2. Modèles ne faisant pas intervenir d'ADN hybride.

Ce type de modèle a été illustré par Stahl (1969) et Paszewski (1970). Dans les deux cas, on aboutit logiquement à des conversions non accompagnées de crossing over. Mais, par cycle de conversion, il reste toujours une chromatide de type parental. Les doubles conversions ne peuvent s'observer que si les deux sites sont convertis au cours de cycles de recombinaison différents. Ni le modèle de Stahl, ni le modèle de Paszewski ne permettent de prédire la probabilité d'un deuxième cycle de recombinaison en fonction de la distance qui le sépare du premier. En d'autres termes, ces modèles ne donnent pas la relation oui existe entre la fréquence de recombinaison et la distance entre les sites.

3. Modèles faisant intervenir l'ADN hybride.

Ces modèles (Holliday 1964, Whitehouse et Hastings 1965) supposent une correction des mauvais appariements de base. La théorie de cette correction a été faite par Fincham et Holliday (1970) et c'est elle que nous examinerons d'abord.

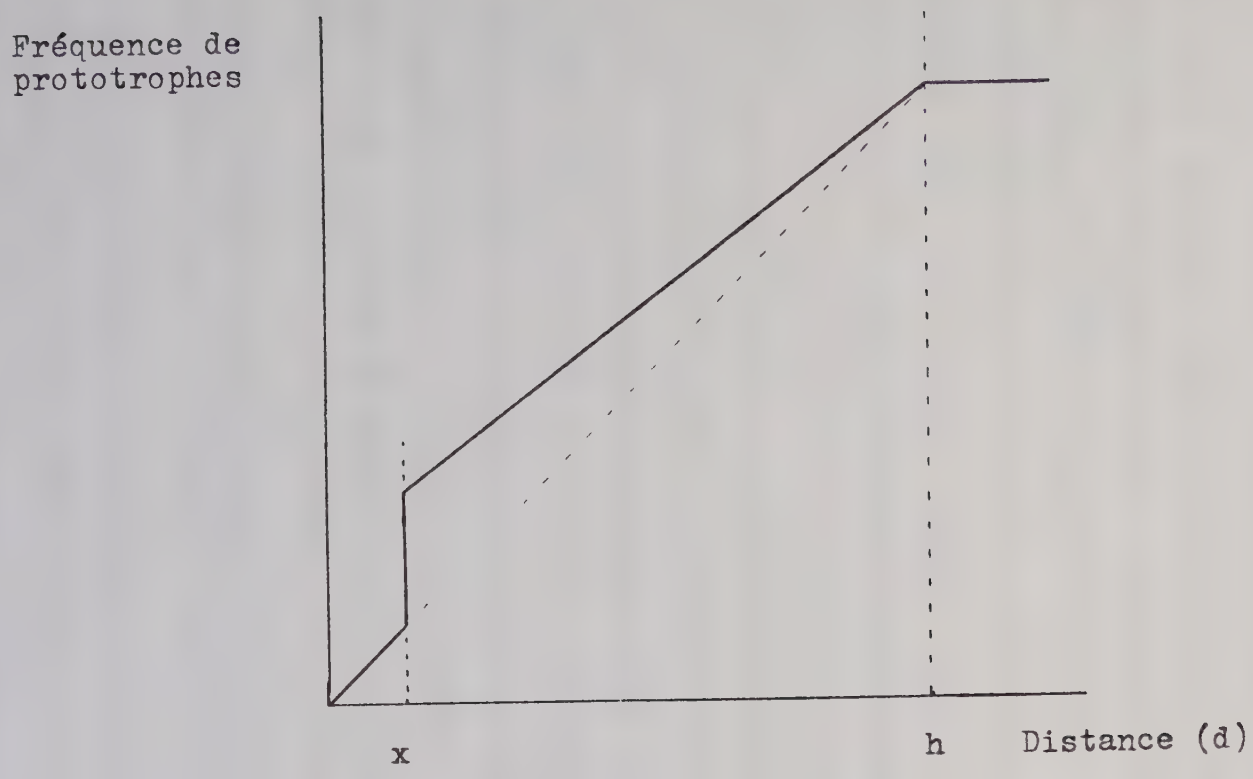


Figure 2.

Courbe théorique reliant la fréquence de recombinaison à la distance entre les sites, dans le cas d'un croisement a+ x +b.

Cette courbe est calculée en admettant: -que l'efficacité de la correction est totale (ségrégation 6:2), -que le rapport $\frac{\text{fréquence de double conversion}}{\text{fréquence de simple conversion}} = \frac{1}{2}\,\frac{h-d}{2d}$, -qu'il n'y a pas de crossing over.

d = distance entre les sites.

x = longueur du fragment d'ADN excisé au cours de la correction.

h = longueur de l'ADN hybride.

Réparation par excision. La courbe qui exprime les relations entre la distance physique et la fréquence de recombinaison dans le cas de faibles distances (recombinaison intragénique) (figure2) présente trois régions distinctes, délimitées par des points d'inflexion.

Dans une première région, quand la distance entre les sites est inférieure à la longueur de l'ADN excisé ($d < x$), les deux sites seront toujours compris dans l'ADN excisé et convertiront simultanément dans le même sens (coconversion). Les prototrophes ne peuvent provenir que d'une interruption de l'ADN hybride entre les deux sites.

Dans la deuxième région, la distance entre les sites est supérieure à la longueur de l'ADN excisé ($d > x$). Les conversions aux deux sites sont donc indépendantes, et peuvent conduire à des prototrophes (double conversion). De plus, il existe toujours la possibilité de recombinaison par interruption de l'ADN hybride entre les deux sites. L'existence de recombinaisons dues aux doubles conversions provoque une discontinuité entre ces deux régions. Cette discontinuité correspond à l'expansion de la carte observée expérimentalement.

Enfin, la troisième région correspond à une distance entre les sites telle qu'ils ne peuvent plus être simultanément sur l'ADN hybride. Les variations de la fréquence de recombinaison ne dépendent plus que des crossing over. En leur absence, la fréquence de recombinaison est fixe, quelque soit la distance entre les sites (contraction de la carte).

Ce modèle définit de façon précise la relation qui unit fréquence de recombinaison et distance entre les sites. Elle ne doit pas être linéaire

4. Relation expérimentale fréquence de recombinaison-distance physique.

Une courbe expérimentale donnant la fréquence de recombinaison en fonction de la distance entre les sites permettrait donc de choisir entre les deux catégories de modèles.

Nous ne connaissons malheureusement pas actuellement de cartes fines établies en recombinaison mitotique spontanée. Par contre, plusieurs cartes ont été construites par recombinaison mitotique induite par les

rayons X. Ce type de recombinaison présente de nombreuses analogies avec la recombinaison spontanée: elle peut se produire pendant la phase G1 et présente des doubles conversions (Wildenberg 1970). Nous les utiliserons donc en toute première approximation.

Les cartes fines établies par recombinaison induite aux rayons X se répartissent en deux catégories suivant que la distance entre les sites est inférieure ou supérieure à 0,8 uRX (1 uRX= 1 prototrophe/ 10^8 cellules /Roentgen. L'unité de longueur en recombinaison induite aux rayons X correspond approximativement à 150 nucléotides).

Pour les gènes où il existe des sites très rapprochés (ade8 Esposito 1968, cyt1 Parker et Sherman 1969) on observe une expansion de la carte qui commence à 0,1 uRX (cyt1) ou à 0,4 uRX (ade8). A partir de 0,8 uRX, les cartes fines établies en recombinaison induite aux rayons X redeviennent linéaires. Ceci montre bien que la longueur de l'ADN mis en jeu au cours d'une conversion est plus petite au cours de la recombinaison mitotique induite par les rayons X qu'au cours de la méïose. En effet, l'expansion de la carte méïotique pour le gène ade8 commence pour une distance de l'ordre de 6 prototrophes/10^3 asques, soit 2,5 uRX (Esposito 1968). Ce fait établi pour la recombinaison mitotique spontanée grâce à l'étude du couple ade3.3 x ade3.6 peut donc être étendu à la recombinaison mitotique induite par les rayons X.

Les autres gènes étudiés: trp5 (Manney et Mortimer 1964), his4 (Fink 1966), isol (Thuriaux, Minet, ten Berge et Zimmerman 1971) ne possèdent pas de sites assez groupés pour pouvoir mettre en évidence l'expansion de la carte. Par contre, ils peuvent être utilisés pour rechercher la distance à partir de laquelle commence la contraction de la carte, prédite par le modèle de Fincham et Holliday (1970). Un point d'inflexion est observé dans le cas du gène ade8 pour une longueur de 4 uRX. Curieusement, ce résultat ne se retrouve pas pour des gènes beaucoup plus longs (his4, isol). Cette contradiction mérite une étude ultérieure. Elle peut provenir de ce qu'il y a beaucoup plus de données pour le gène ade8, et que la contraction de la carte est passée inaperçue dans les autres cas.

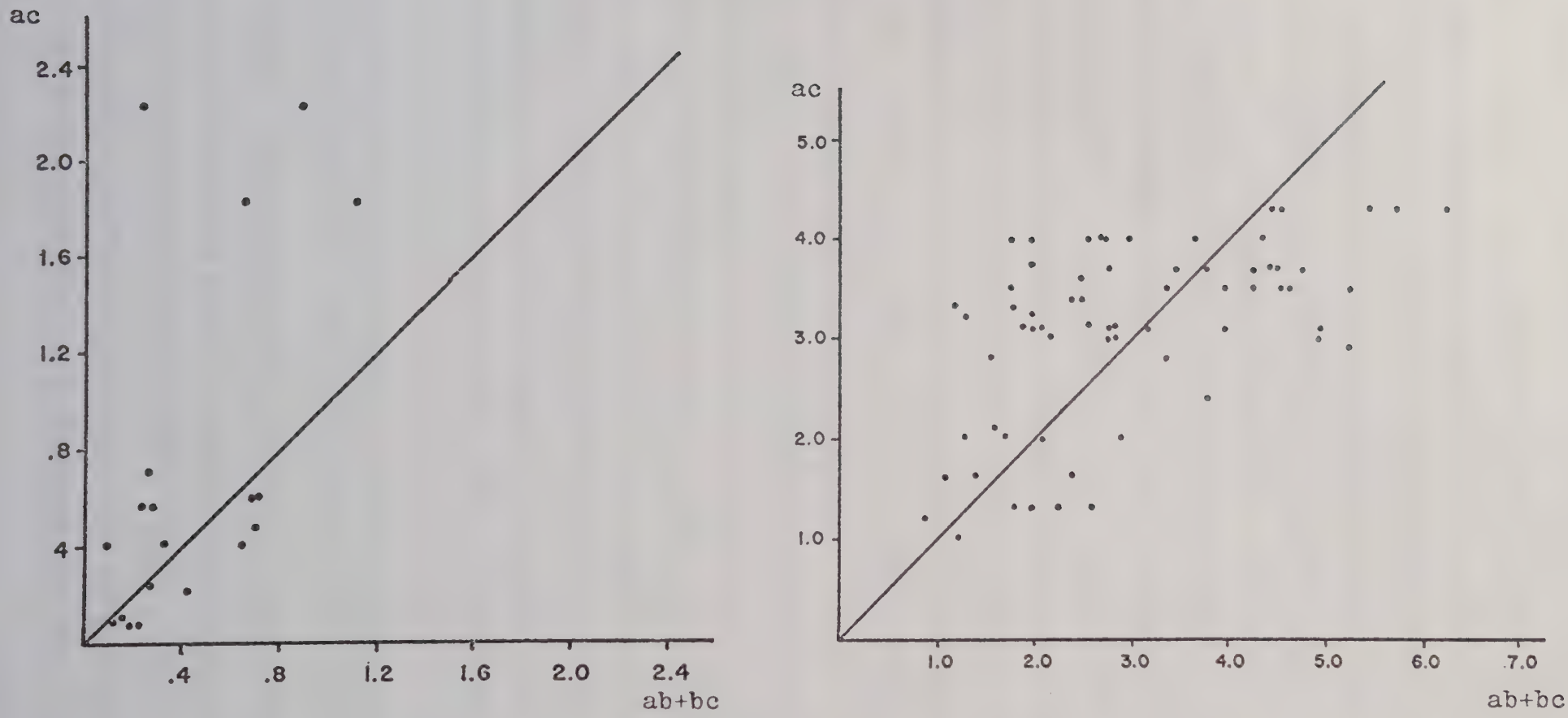


Figure 3.

Relation entre la fréquence de recombinaison et la distance entre deux sites dans le cas du gène ade8 (Esposito 1968).

L'unité utilisée est de 1 prototrophe/10^8 cellules viables/1 Roentgen.

5. Vérification expérimentale du modèle de Fincham et Holliday.

L'accord entre la courbe théorique (figure 2) et la courbe expérimentale (figure3) est tout à fait remarquable. Ce fait est extrêmement important car c'est la première vérification expérimentale de ce modèle. En effet, l'étude de la recombinaison méïotique ne montre jamais autre chose que la première région linéaire et l'expansion de la carte, en raison de la longueur importante de l'ADN excisé.

La longueur moyenne de l'ADN excisé au cours de la recombinaison mitotique induite par les rayons X peut être calculée grâce à la figure 3. Elle est de l'ordre de 75 nucléotides.

Bien qu'il ne soit pas possible de déterminer avec certitude la longueur de l'ADN hybride au cours de la recombinaison mitotique, il est probable que cette longueur ne doit pas être très grande. En effet, il semble que la fréquence des doubles conversions décroit très vite quand la distance entre les sites augmente.

Il existe cependant des faits non expliqués par la théorie: 1) La contraction de la carte pour les très faibles distances, comme le montre l'étude du gène cyt1. 2) La corrélation qui existe entre les corrections sur les deux chromatides. En effet, si les corrections sur les deux chromatides pouvaient se faire en sens opposé, on aboutirait à une ségrégation identique à celle d'un crossing over intragénique, ce qui n'a jamais été observé au cours de la recombinaison mitotique spontanée.

Mécanismes conduisant à la formation d'un ADN hybride. Les modèles de Holliday (1964) et de Whitehouse et Hastings (1965) peuvent tous les deux rendre compte de la recombinaison intragénique mitotique. Cependant les relations entre crossing over et recombinaison intragénique sont probablement moins directes que dans ces modèles.

CONCLUSION

Chez Saccharomyces cerevisiae, au cours de la phase végétative, une fraction de la population est formée de cellules aptes à recombiner. Dans ces cellules, des recombinaisons se produisent sur plusieurs chromosomes simultanément, pendant la phase G1 et peut-être aussi au stade quatre chromatides. Ce sont principalement des conversions, la fréquence des crossing over étant très faible.

Les modèles faisant intervenir l'ADN hybride rendent compte de la recombinaison intragénique, tant méïotique que mitotique. Dans les deux cas, les corrections des mauvais appariements de base se font par excision, mais le fragment d'ADN excisé au cours de ce phénomène est plus petit pendant la recombinaison mitotique que pendant la recombinaison méïotique.

Il existe des problèmes d'interférence non résolus: Une conversion dans un gène est souvent accompagnée d'autres conversions, à des sites distants de 15 et même 30 centiMorgan. Les crossing over sont associés à une recombinaison intragénique.

BIBLIOGRAPHIE.

Emerson S. Linkage and recombination at the chromosome level. In: Genetic organization. Caspari et Ravin eds. p 267-360. New York. Academic Press (1969).

Esposito M.S. X.ray and meiotic fine structure mapping of the adenine8 locus in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 58 507-527 (1968)

Fincham J.R.S. et Holliday R. An explanation of fine structure map expansion in terms of excision repair. Molec. gen. Genetics 109 309-322 (1970).

Fink G.R. A cluster of genes controlling three enzymes in histidine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 53 445-459 (1966).

Fogel et Hurst D.D. Meiotic gene conversion in yeast tetrad and the theory of recombination. Genetics 57 455-481 (1967).

Fogel S. et Mortimer R.K. Informational transfer in meiotic gene conversion. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 62 96-103 (1969).

Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5 282-304 (1964).

Hurst D.D. et Fogel S. Mitotic recombination and heteroallelic repair in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 50 435-458 (1964).

Johnston J.R. Genetic analysis of spontaneous half sectored colonies of Saccharomyces cerevisiae. Genet. Res. 18 179-184 (1971).

Jones E.W. Fine structure analysis of the ade3 locus in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 70 233-250 (1972).

Kakar N.S. Allelic recombination and its relation to recombination of outside markers in yeast. Genetics 48 957-966 (1963).

Luzzati M., Clavilier L., Péré-Aubert G., Slonimski P.P. Contrôle biochimique de la recombinaison chez Saccharomyces cerevisiae

1. Inhibition par la L.histidine de la recombinaison intragénique mitotique au locus ade3. Molec. gen. Genetics 111 120-137 (1971).

Manney T.R. et Mortimer R.K. Allelic mapping in yeast by X.ray induced mitotic reversion. Science 143 581-583 (1964).

Mortimer R.K. et Hawthorne D.C. Genetic mapping in Saccharomyces. Genetics 53 165-173 (1966).

Nakai S. et Mortimer R.K. Studies of the genetic mechanism of radiation induced mitotic segregation in yeast. Molec. gen. Genetics 103 329-338 (1969).

Parker J.H. et Sherman F. Fine structure mapping and mutational studies of gene controlling yeast cytochrome c. Genetics 62 9-22 (1969).

Paszewski A. Gene conversion: observations on the DNA hybrid models. Genet. Res. 15 55-64 (1970).

Roman H. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast. Compte-rendu des travaux du Laboratoire Carlsberg. (Ser. Physiol.) 26 299-314 (1956a).

Roman H. Studies of gene mutation in Saccharomyces. Cold Spr. Harb. Symp quant. Biol. 21 175-185 (1956b).

Roman H. Sur les recombinaisons non réciproques chez Saccharomyces cerevisiae et sur les problèmes posés par ces phénomènes. Ann. de Génétique 1 11-17 (1958).

Roman H. et Jacob F. A comparaison of spontaneous and ultraviolet induced allelic recombination with reference to the recombination of outside markers. Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 23 155-160 (1958).

Sherman F. et Roman H. Evidence for two types of allelic recombination in yeast. Genetics 48 255-261 (1963).

Stahl F.W. One way to think about gene conversion.Genetics Supl. 61 (1) 1-13 (1969).

Thuriaux P. , Minet M., ten Berge A.M.A. et Zimmerman F.K. Genetic fine structure and function of mutants at the ilv1 gene locus of Saccharomyces cerevisiae. Molec. gen. Genetics 112 60-72 (1971).

Whitehouse H.L.K. et Hastings P.J. The analysis of genetic recombination on the polaron hybrid DNA model. Genet. Res. 6 27-92 (1965).

Wildenberg J. The relation of mitotic recombination to DNA replication in yeast pedigree. Genetics 66 291-304 (1970).

Wilkie D. et Lewis D. The effect of ultraviolet light on recombination in yeast. Genetics 48 1701-1716 (1963).

CHAPITRE V11.

DISCUSSION GENERALE.

Notre étude de la recombinaison mitotique spontanée chez Saccharomyces cerevisiae et des facteurs l'influençant nous a fait aborder un certain nombre de grands problèmes, tels que:

- les relations entre recombinaison et transcription.
- l'existence d'un ou de plusieurs mécanismes de recombinaison dans un même organisme eucaryote.
- le mécanisme de l'appariement d'échange et son contrôle.

Au cours de ce chapitre, nous tenterons de faire une mise au point pour chacun de ces problèmes en nous aidant tant des connaissances établies grâce à l'étude de Saccharomyces cerevisiae que des résultats obtenus chez d'autres Eucaryotes.

RECOMBINAISON ET TRANSCRIPTION.

Différents auteurs (Luzzati 1965, Whitehouse 1966) ont tenté indépendamment d'établir les prédictions d'un modèle de régulation du type opéron pour la recombinaison. Ils ont abouti à l'idée d'une régulation coordonnée de la transcription et de la recombinaison.

Les preuves expérimentales d'un tel modèle seront de deux types. Soit il est possible de prouver qu'un métabolite modifie la recombinaison dans les gènes qui codent pour les enzymes de sa chaîne de biosynthèse. Soit on établit que les gènes assurant le contrôle fin de la recombinaison, c'est-à-dire qu'ils ne modifient la recombinaison qu'à un nombre limité de loci, ont aussi une action sur l'activité hétérocatalytique de ces gènes.

La première voie de recherche a surtout été illustrée chez les bactéries ce qui est logique puisque ce sont les seuls organismes où la caractérisation des opérons est claire. L'interaction entre recombinaison et transcription est nulle (Shestakov et Barbour 1967) ou très faible (Helling 1967, Herman 1968).

L'analyse du contrôle fin de la recombinaison est principalement faite chez les Eucaryotes (Simchen et Stamberg 1969 a). La situation génétique est particulièrement bien établie chez Neurospora (Catcheside D.G. 1968) et Schizophyllum commune (Simchen et Stamberg 1969 b). Dans le cas de Neurospora crassa, Catcheside D.E.A. (1968) a étudié l'action d'un mutant rec sur la régulation d'une activité enzymatique. Il s'est intéressé au mutant rec3 qui modifie la fréquence de recombinaison entre des allèles du gène aml (gène de structure de la NADP spécifique glutamate déshydrogénase EC 1.4.1.4). Il n'a trouvé aucune action du mutant rec3 sur la répression de l'enzyme codée par le gène aml. Il est possible d'objecter que l'action du mutant rec3 sur la recombinaison n'est sensible qu'au cours de la méïose, alors que son effet sur la régulation au locus aml a été testé au cours de la phase végétative. Mais la démonstration, par Catcheside et Austin (1969) que le mutant rec3 contrôle aussi la recom-

binaison au locus his2 rend l'hypothèse d'une régulation commune de la recombinaison et de la transcription à peu près indéfendable.

Après les échecs subis au cours des différentes tentatives pour mettre en évidence un élément commun à la régulation de la recombinaison et de la transcription, il ne restait plus comme exemple possible en faveur d'un modèle du type opérateur que le cas du gène ade3 chez Saccharomyces cerevisiae. Il est en effet établi (Luzzati, Clavilier, Péré 1963) que la carence en histidine provoque une très forte augmentation de la fréquence de recombinaison intragénique, au locus ade3 et que le gène gouverne la synthèse de l'histidine. Il était donc essentiel de vérifier si l'histidine a une action spécifique au locus ade3, comme le prédit le modèle d'un opérateur commun à la recombinaison et à la transcription ou si elle a une action sur l'ensemble du génôme. En utilisant des diplo des hétéroallèliques à deux loci non liés, tels que $\frac{ade3.3}{ade3.6}\ \frac{ura2.18}{ura2.30}$ et $\frac{ade3.3}{ade3.6}\ \frac{isol.a}{isol.b}$ (chapitre II) nous avons pu montrer que l'histidine agit sur la recombinaison mitotique spontanée dans l'ensemble du génôme quand ade3 est homozygote. Cette généralisation de "l'effet histidine" invalid totalement le modèle opérateur en tant qu'hypothèse pour rendre compte du phénomène observé par Luzzati, Clavilier et Péré (1963).

Il ne reste donc actuellement aucun résultat expérimental en faveur d'un modèle de régulation du type opéron pour la recombinaison.

PLURALITE DES MECANISMES DE RECOMBINAISON.

Il est généralement admis qu'il n'y a qu'un mécanisme de recombinaison chez les Eucaryotes, que le crossing over n'est pas un phénomène indépendant de la conversion, mais la conséquence directe de celle-ci (Hurst, Fogel et Mortimer 1972) et que la recombinaison pendant la phase végétative est très semblable à la recombinaison méïotique (Whitehouse 1970).

Ces idées trouvent peut-être leur origine dans le fait qu'on observe presque toujours le même phénomène, c'est-à-dire une méïose totalement achevée. Il est donc fondamental d'étudier la recombinaison dans des conditions les plus variées possible, et de comparer les résultats entre eux au sein d'un même organisme pour établir si le mécanisme de la recombinaison est vraiment unique.

Saccharomyces cerevisiae se prête particulièrement bien à ce travail car il est possible d'étudier la recombinaison mitotique spontanée, ou induite par divers agents et la recombinaison méïotique tant au cours d'une méïose normale qu'au cours d'une méïose interrompue pendant la prophase de première division. C'est donc l'organisme pour lequel nous avons le plus de données. Nous évoquerons aussi le cas d'autres organismes

SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

1. MEIOSE.

Méïose complète.

L'étude de la recombinaison méïotique au moyen de l'analyse de tétrades met en évidence un comportement très classique de S. cerevisiae. Les cartes fines présentent le phénomène d'expansion de la carte. La non-linéarité de la relation entre distance physique et fréquence de recombinaison commence pour des fréquences de l'ordre de 6 prototrophes pour 10^3 asques (Esposito 1968, Jones 1972). Au cours de la recombinaison intragénique, il se produit des conversions mettant en jeu deux sites simultanément, d'autant plus fréquemment que ces sites sont plus proches. Ces conversions simultanées sont sans exception des coconversions, c'est-à-dire que si les allèles sont en position trans, lorsque l'un d'eux fait une conversion 3+:1-, l'autre fait une conversion 3-:1+ (Fogel et Mortimer 1969). Enfin, les conversions à un locus donné sont associées une fois sur deux à un crossing over entre les marqueurs externes lorsque ceux-ci sont distants de moins de 20 centimorgans (Hurst, Fogel et Mortimer 1972).

L'ensemble de ces résultats s'intègre totalement dans un modèle de recombinaison dans lequel il y a formation d'un ADN hybride et qui fait du crossing over une conséquence directe de la conversion (Holliday 1964, Whitehouse et Hastings 1965).

Méïose avortée.

L'étude de la recombinaison dans des cellules en cours de méïose va compliquer ce shéma. Cette étude a été faite par Sherman et Roman (1963

TABLEAU 1.

Temps d'incubation en milieu de sporulation (heures)	Fréquence des $^+$ isol	Degré de ploïdie	Phénotype des isol$^+$			% des isol$^+$ avec une recombinaison des marqueurs externes
			Nombre de colonies testées	his$^-$	trp$^-$	
0	$1{,}9\ 10^{-5}$	100% 2n	96	0	5	5,8
8	$54\ 10^{-5}$	99% 2n	114	5	0	4,4
20	$270\ 10^{-5}$	15% 2n	non testé			
		85% 1n	94	tableau 2		73

Fréquence et caractéristiques des recombinés isol$^+$ obtenus après différents temps d'incubation en milieu de sporulation.

Génotype de la souche $\frac{thr3 \quad + \quad isol.b \quad trp2}{+ \quad his1 \quad isol.a \quad +}$

TABLEAU 2.

Génotype			Effectif
Parental			
thr3	+	trp2	1
+	hisl	+	25
Recombiné			
+	hisl	trp2	9
thr3	+	+	57
+	+	+	2

Génotype des 94 clônes haploïdes $isol^+$ du tableau 1.

Les tableaux 1 et 2 sont ceux de l'article de Sherman et Roman (1963).

Elle est rendue possible par le fait que la méïose est induite par le passage des cellules en milieu acétate et que,tant que la prophase de première division n'est pas achevée, il est possible de les ramener en phase végétative, c'est-à-dire que les cellules restent diploïdes, en les mettant dans un milieu sans acétate.

Les résultats de cette étude figurent dans les tableaux 1 et 2. Les faits marquants sont:

1) Lorsque la méïose est interrompue au bout de 8 heures en milieu de sporulation, ce qui correspond au moment où se fait la duplication de l'ADN et la différenciation des complexes synaptonématiques (Moens et Rapport 1971), les cellules restent toutes diploïdes et les conversions observées ne sont pas associées à des crossing over . Les recombinaisons intragéniques observées à ce stade représentent 20% des recombinaisons se produisant au cours d'une méïose complète dans l'expérience représentée. Cette valeur atteint couramment 50% dans d'autres expériences.

2) Au bout de 20 heures en milieu de sporulation, la plupart des cellules sont haploïdes. Les recombinaisons intragéniques sont associées à un remaniement des marqueurs externes, dans 73% des cas. Il est très tentant de conclure qu'au cours de la méïose, il existe deux cycles de recombinaison. Un premier associé à la réplication de l'ADN, pendant lequel il se produit des conversions sans que celles-ci conduisent à des crossing over et un deuxième cycle, plus tardif au cours duquel se produiraient des recombinaisons intragéniques qui seraient toutes associées à un crossing over. Si les deux cycles de recombinaison participent de façon équivalente à la formation de recombinés intragéniques, on aboutit bien au fait que 50% des conversions sont associées à un crossing over, mais cette association n'a plus du tout la même signification.

L'importance de ce travail est évidente. La principale objection que l'on puisse lui faire est, nous semble-t-il, la suivante. Il n'est pas prouvé que les recombinaisons observées lorsqu'on interrompt la méïose au bout de 8 heures aient effectivement lieu au cours du cycle méïotique.

Il est possible qu'après 8 heures en milieu de sporulation, les cellules ne soient qu'à une étape préliminaire de la recombinaison, par exemple l'appariement des chromosomes. Si ces cellules sont laissées en milieu acétate, la recombinaison méïotique aura lieu. Par contre, si elles sont remises en milieu sans acétate, la recombinaison sera detype végétatif, et l'incubation pendant 8 heures en milieu acétate aura joué un rôle équivalent à la carence en histidine dans le "système ade3".

Esposito, Frink et Esposito (1971) ont isolé trois mutants de méïose spo1, spo2 et spo3. Ces trois mutants bloquent la sporulation en milieu acétate. Si après 12 heures en milieu de sporulation, les cellules sont ramenées en milieu sans acétate, on observe des recombinaisons du même type que celles décrites par Sherman et Roman (1963). Mais, dans le cas des souches spo1, spo2 et spo3, le nombre absolu des prototrophes provenant d'une recombinaison intragénique décroit si l'incubation en milieu acétate se prolonge. La fréquence de recombinaison intragénique retombe au niveau de la fréquence de recombinaison mitotique spontanée après 48 heures en milieu de sporulation. Il faut remarquer que tous ces phénomènes sont observés sans qu'il y ait une mortalité particulière pendant l'expérience.

Notre interprétation est la suivante. Au bout de 12 heures en milieu de sporulation, les conditions nécessaires pour que la recombinaison ait lieu sont réunies, mais la recombinaison elle-même ne peut avoir lieu, à cause des mutations spo. Si les cellules sont mises en milieu sans acétate, il se produit alors une recombinaison de type végétatif. Si les cellules sont laissées en milieu acétate, l'aptitude à recombiner, qui est due au concours d'un certain nombre de facteurs, va disparaître et il sera de plus en plus difficile aux recombinaisons de se produire.

Dans l'hypothèse de Sherman et Roman (1963) où les recombinaisons observées sont des recombinaisons méïotiques, les prototrophes obtenus au temps 12 heures sont issus de recombinaisons ayant eu lieu dans les cellules en milieu de sporulation. Si, dans le cas des souches spo1, spo2 et spo3

le nombre des recombinés prototrophes diminue au cours du temps, c'est qu'un mécanisme annule ces recombinaisons. Dans cette hypothèse donc, les résultats obtenus par Esposito, Frink et Esposito (1971) montrent qu'il existe un mécanisme qui peut annuler les recombinaisons aussitôt après qu'elles aient eu lieu ("cross over cancellation hypothesis" Whitehouse 1967). Dans une souche sauvage, ce mécanisme est peu actif puisque la fréquence de recombinaison continue à croître au cours du temps (tableau 1). Par contre, la fonction régulatrice de ce mécanisme est désorganisée chez les mutants spo1, spo2 et spo3 puisque dans ce cas toutes les recombinaisons sont annulées.

Il est possible de trancher entre l'hypothèse de Sherman et Roman (1963) et la nôtre en caractérisant génétiquement la recombinaison qui se produit au stade 8-12 heures en milieu de sporulation. Nous avons en effet montré que la recombinaison intragénique pendant la phase végétative se caractérise par l'existence de doubles conversions, doubles conversions qui ne sont jamais observées au cours de la recombinaison méïotique (chapitre VI). Il suffit donc de regarder si parmi les recombinés obtenus au stade 8-12heures, certains sont la conséquence d'une double conversion, en utilisant de préférence un couple d'allèles pour lequel cette fréquence de double conversion est élevée (par exemple ade3.3 x ade3.6).

Méïose résumé.

La recombinaison méïotique, étudiée par le moyen de l'analyse de tétrades, s'interprète complètement à l'aide d'un modèle du type de celui de Holliday (1964).

Il est cependant possible, bien que ce ne soit pas démontré de façon irréfutable, que le mécanisme de la recombinaison méïotique soit plus complexe. Il y aurait deux cycles de recombinaison. Pendant un premier cycle, associé à la duplication de l'ADN et à la différenciation des

des complexes synaptonématiques, il se produirait des recombinaisons intragéniques non associées à des crossing over. Au cours d'une deuxième phase, il y aurait des recombinaisons intragéniques systématiquement suivies de crossing over. Dans cette hypothèse l'association conversion crossing over dépendrait d'un équilibre entre les deux mécanismes de recombinaison.

2. RECOMBINAISON MITOTIQUE SPONTANEE .

Pour l'essentiel, le mécanisme de la recombinaison mitotique spontanée n'a été établi que très récemment. L'exposé des résultats expérimentaux et leur discussion en termes de modèles moléculaires de recombinaison ayant fait l'objet du chapitre VI, nous ne ferons qu'un bref rappel dans ce paragraphe en insistant sur les différences avec la recombinaison méïotique.

Caractéristiques.

Les caractéristiques de la recombinaison mitotique spontanée sont les suivantes. La recombinaison peut se produire pendant la phase G1, lorsque chaque chromosome n'est constitué que d'une chromatide. Les crossing over sont exceptionnels. Au cours de la recombinaison intragénique, il existe des doubles conversions au cours desquelles deux sites placés sur un même brin d'ADN peuvent convertir dans des sens différents. Enfin, il n'a jamais été mis en évidence de recombinaison intragénique réciproque.

Recombinaison au stade deux chromatides.

Nous discuterons l'importance du fait que la recombinaison puisse se produire avant la réplication de l'ADN dans le sous chapitre consacré

au mécanisme de l'appariement d'échange. Dans un premier temps, il faut remarquer que ceci fait une différence importante entre la recombinaison mitotique et la recombinaison méïotique.

Recombinaison intragénique.

Mais les différences fondamentales entre ces deux types de recombinaison apparaissent surtout au niveau de la recombinaison intragénique. Nous avons résumé dans le paragraphe précédent les faits qui sont en faveur d'un modèle de recombinaison méïotique du type de celui de Holliday (1964). L'interprétation de la recombinaison mitotique n'est pas aussi évidente. Elle peut être tentée aussi bien avec des modèles ne faisant pas intervenir d'ADN hybride (Stahl 1969, Paszewski 1970), qu'avec des modèles faisant intervenir l'ADN hybride (Fincham et Holliday 1970) Nous envisagerons les deux possibilités dans l'ordre.

Les arguments en faveur du premier type de modèle sont l'absence de crossing over et l'absence de recombinaison intragénique réciproque. Mais ces modèles ne permettent d'expliquer les doubles conversions que par deux cycles de recombinaison différents. La fréquence des doubles conversions décroissant quand la distance entre les sites augmente, il faut faire une hypothèse supplémentaire qui lie la probabilité d'une deuxième recombinaison à la distance qui la sépare de la première.

Les arguments en faveur du deuxième type de modèle sont exactement inverses. On comprend parfaitement l'existence de double conversion et la variation de leur fréquence en fonction de la distance entre les sites Il est possible de concevoir des modèles où la formation d'ADN hybride n'entraîne pas un crossing over mais l'asymétrie du mécanisme de conversion pose un problème difficile. Nous entendons par asymétrie du mécanisme de conversion le fait que le sens de la correction sur un des hétéroduplex n'est pas indépendant du sens de la correction sur l'autre, ce qui se traduit par l'absence de recombinaison intragénique réciproque.

L'explication classique, qui consiste à supposer que l'hétéroduplex ne se forme que sur une des chromatides n'est pas satisfaisante dans notre cas puisque les doubles conversions s'expliquent par le fait que les deux sites sont sur l'ADN hybride simultanément.

Aucun des deux types de modèle n'est entièrement satisfaisant. Mais, dans les deux cas, il faut supposer que la longueur de l'ADN excisé au cours de la recombinaison (Paszewski 1970) ou au cours de la réparation (Fincham et Holliday 1970) est plus petite pendant la recombinaison mitotique que pendant la recombinaison méïotique, puisqu'il n'y a que dans la première que l'on rencontre des doubles conversions. Ceci montre donc une différence profonde, au niveau moléculaire, entre le mécanisme de la recombinaison mitotique et celui de la recombinaison méïotique.

Crossing over.

La très faible fréquence des crossing over mitotiques, même associés à une recombinaison intragénique (Kakar 1963) n'indique une différence qualitative avec la recombinaison méïotique que si les crossing over, qui sont associés aux conversions dans 50% des cas au cours de la méïose, sont produits pendant le même cycle de recombinaison que les conversions. Dans le cas où il existe plusieurs cycles de recombinaison (hypothèse de Sherman et Roman 1963), la rareté des crossing over au cours de la recombinaison mitotique indique simplement que le mécanisme est très peu efficace au cours de la phase végétative.

Recombinaison mitotique spontanée résumé.

La recombinaison mitotique spontanée se fait selon un mécanisme différent de celui de la recombinaison méïotique. La différence existe tant au niveau de la phase pendant laquelle se fait la recombinaison

(Stade deux ou quatre chromatides) qu'au niveau des mécanismes moléculaires (taille de l'ADN excisé). D'autre part, on ne peut pas appliquer sans hypothèse supplémentaire, ni les modèles basés sur l'existence d'un ADN hybride (Fincham et Holliday 1970), ni les modèles ne faisant pas intervenir d'hétéroduplex (Paszewski 1970), à la recombinaison mitotique spontanée. Nous verrons dans le paragraphe suivant, les raisons pour lesquelles nous sommes actuellement plutôt favorables à un modèle du type ADN hybride.

3. RECOMBINAISON MITOTIQUE INDUITE PAR LES RAYONS X.

Recombinaison intragénique.

La recombinaison induite par les rayons X présente de nombreuses analogies avec la recombinaison spontanée. Elle se produit au stade deux chromatides, et elle présente des doubles conversions (Wildenberg 1970). En première approximation, nous avons donc appliqué les concepts élaborés pour la recombinaison mitotique spontanée à l'analyse des cartes fines établies aux rayons X.

Nous avons démontré que la longueur de l'ADN excisé est plus petite au cours de la recombinaison mitotique qu'au cours de la recombinaison méiotique. Dans le modèle de Fincham et Holliday (1970) on peut prédire une expansion de la carte pour de faibles distances. Cette expansion ne pourra être mise en évidence que dans les cas où il existe des sites suffisament proches. Nous en avons trouvé deux exemples parmi l'ensemdes cartes publiées (ade8 Esposito 1968 , cyt1 Parker et Sherman 1969) Ils donnent une longueur approximative de 75 nucléotides au fragment d'ADN excisé. Le modèle prédit aussi une contraction de la carte quand la distance entre les sites est supérieure à la longueur de l'ADN hybride. Nous avons trouvé une contraction de la carte dans le gène ade8 pour une longueur de 600 nucléotides. La longueur de l'ADN hybride au

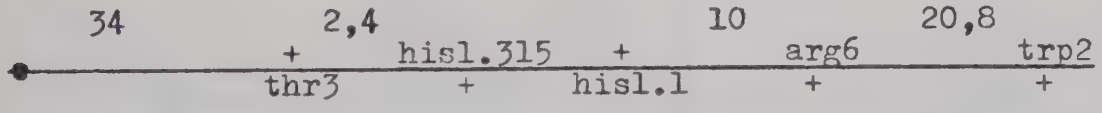
cours de la recombinaison mitotique est inférieure à celle observée au cours de la recombinaison méïotique. En effet, il n'a jamais été montré de contraction de la carte au cours de la recombinaison méïotique. Ceci fait donc encore une différence au niveau moléculaire entre la recombinaison mitotique et la recombinaison méïotique.

L'efficacité du modèle de Fincham et Holliday (1970) pour prédire la forme de la relation entre la distance physique et la fréquence de recombinaison nous semble un argument très fort en faveur d'un mécanisme de recombinaison faisant intervenir de l'ADN hybride. En effet, il n'existe pas actuellement d'hypothèses satisfaisantes qui permettraient de rendre compte de cette relation en termes du modèle de Paszewski (1970).

Différences entre la recombinaison mitotique induite par les rayons X et la recombinaison spontanée.

L'étude de la recombinaison mitotique induite par les rayons X (Wildenberg 1970) met en évidence des différences, au niveau de la recombinaison intragénique, avec la recombinaison spontanée. Wildenberg a fait l'expérience suivante:

Des cellules synchronisées de génotype



(distance his1.1 his1.315 = 4,4 prototrophes/10^8 cellules/ Roentgen Snow et Korch 1970)

sont irradiées aux rayons X pendant la phase G1 puis étalées sur du milieu sans histidine. Les cellules qui bourgeonnent (donc de phénotype his+) sont reprises par micromanipulation et le premier bourgeon est séparé. Les génotypes des deux cellules issues de la première division sont ensuite établis par l'analyse de tétrades. Cette technique présente l'avantage de permettre l'analyse de toutes les chromatides de la

TABLEAU 3.

Génotype	$\frac{his1.315}{+}$	$\frac{+}{his1.1}$	$\frac{his1.1,315}{+}$	$\frac{\pm}{\pm}$	$\frac{his1.315}{+ \atop \pm}$	$\frac{+}{his1.1 \atop \pm}$	$\frac{his1.315}{+ \atop his1.1}$	$\frac{his1.315}{+ \atop his1.1,315}$	$\frac{+}{his1.1 \atop his1.1,315}$
Effectif Σ 124	39	60	5	9	3	1	3	2	2
Origine (a)	Divers		1 4+:4- 4+:4-^{p}	2 6+:2- 6+:2-	3 5+:3- 6+:2-	1 6+:2- 5+:3-	3 5+:3- 5+:3-	2 4+:4- 5+:3-	2 5+:3- 4+:4-
			4 Crossing over intragénique en: G1	1 5+:3- 5+:3- 5 (b) 1 6+:2- 4+:4-^{p}					

TABLEAU 3.

Effectif des différents types de clônes que l'on aurait obtenus en analysant l'échantillon d'his1^{+} de Wildenberg (1970) à l'aide de notre technique (cf chapitre VI) et leur origine.
(Croisement his1.315 x his1.1)

(a) Les résultats sont présentés de la façon suivante:

Effectif
Ségrégation de l'allèle his1.315
Ségrégation de l'allèle his1.1

4+:4-^{p} = 4+:4- aberrant donnant une ségrégation post-méïotique dans le cas des organismes à octades.

(b) Ces 5 clônes peuvent provenir:

-Soit d'une ségrégation 6+:2- (315), 4+:4- (1) au cours de la phase G1 suivie d'un crossing over entre le gène his1 et son centromère en G2.

-Soit d'une ségrégation 6+:2- (315), 4+:4-^{p} (1) au cours de la phase G1.

cellule dans laquelle s'est produit une recombinaison, même si une des cellules filles n'est pas prototrophe (ce qui fut le cas dans 47 des 124 clônes analysés).Nous avons repris les 124 clônes his^+ analysés par Wildenberg et nous les avons classés en différentes catégories de clônes homogènes et de clônes mixtes (tableau 3). Ces catégories correspondent aux catégories que l'on aurait obtenues si les deux cellules filles issues de la cellule irradiée n'avaient pas été séparées et si il n'y avait pas de marqueurs pour encadrer le gène hisl. Exprimés ainsi, les résultats de Wildenberg sont donc directement comparables à ceux que nous avons obtenus en étudiant la recombinaison intragénique spontanée (chapitre VI). Dans la dernière ligne du tableau 3, nous avons indiqué l'origine des clônes classés dans les différentes catégories tels que permettent de l'établir les résultats complets de Wildenberg.

Il apparaît dans trois catégories de clônes le double mutant hisl.1,315.

Au cours de la recombinaison mitotique spontanée, il n'a jamais été observé de recombinés doubles mutants. L'absence de clônes ab/++ s'explique bien si l'on suppose qu'il n'y a jamais de crossing over intragénique et que pour les allèles étudiés, la correction est efficace. L'absence de crossing over intragénique est probablement significative. En effet, la fréquence de crossing over est de 4/124 entre hisl.315 et hisl.1 (distance méïotique entre ces deux sites 4,2 prototrophes/10^3 asques,Fogel et Hurst 1967) au cours de la recombinaison induite par les rayons X alors qu'elle est de 0/203 entre ade3.3 et ade3.6 (distance 3 prototrophes/10^3 asques,chapitre VI) et de 0/128 entre isol.a et isol.b (distance 20 prototrophes/10^3 asques, Roman et Jacob 1958, Kakar 1963) au cours de la recombinaison mitotique spontanée.

L'absence de clônes mixtes du type +b/++, ab/++ au cours de la recombinaison mitotique spontanée est plus surprenante. Ces clônes ont pour origine une conversion 5+:3- à l'un des sites, l'autre ne participant

pas à la recombinaison. Une telle ségrégation (5+:3- (a) , 4+:4- (b)) peut conduire soit à un clône +b/++ si la correction se fait sur la chromatide portant l'allèle b, soit à un clône mixte +b/++, ab/++ si la correction se fait sur la chromatide portant l'allèle b^+. Pour une raison inconnue, les deux types de correction ne sont pas aussi probables. Dans le cas étudié par Wildenberg, sur 27 ségrégations 5+:3- (315) 4+:4- (1), 2 ont donné un clône mixte et sur 7 ségrégations 4+:4- (315) 5+:3- (1), 2 aussi ont donné un clône mixte. On peut supposer qu'au cours de la recombinaison spontanée, dans les cas étudiés jusqu'ici, la disproportion entre les probabilités des deux types de correction est encore plus grande, ce qui fait que ces types de clônes n'ont jamais été observé.

Il semble donc que certaines différences observées entre la recombinaison mitotique spontanée et la recombinaison induite par les rayons X ne soient pas significatives et nous pouvons donc postuler l'existence d'un mécanisme derecombinaison commun.

L'existence de crossing over intragéniques au cours de la recombinaison induite par les rayons X pose un problème. Si crossing over et conversions se produisent en une seule étape, il y a là une différence inexpliquée entre les deux types de recombinaison. Par contre si le crossing over et la conversion se produisent au cours de deux cycles de recombinaison différents, et que le crossing over est plus rare au cours de la recombinaison spontanée, il n'existe pas de différences qualitatives entre la recombinaison intragénique mitotique induite par les rayons X et la recombinaison mitotique intragénique spontanée.

Mécanismes conduisant à l'homozygotie.

A la suite d'une recombinaison mitotique, on obtient parfois un clône auxotrophe qui a pour origine le fait qu'un mutant qui était à l'état hétérozygote dans le diploïde de départ est devenu homozygote.

TABLEAU 4.

Génotype (a)			Ségrégation au locus thr3	Effectif
thr3	arg6	trp2		
+	−	−	Génotype parental	
+	−	−		
−	+	+		
−	+	+		
−	−	−	2+:6−	5
−	−	−		
−	+	+		
−	+	+		
+	−	−	6+:2−	3
+	−	−		
+	+	+		
+	+	+		
+	−	−	3+:5−	9
−	−	−		
−	+	+		
−	+	+		
+	−	−	5+:3−	4
+	−	−		
+	+	+		
−	+	+		
+	−	−	$4+:4-^{p}$	4
−	−	−		
+	+	+		
−	+	+		
+	−	−	Crossing over en G2	2
−	+	+		
+	−	−		
−	+	+		

TABLEAU 4.

Evènements survenus au locus thr3 dans les 124 clônes his$^+$ analysés.
(Ce tableau a été établi à l'aide des résultats de Wildenberg 1970).

Génotype du diploïde d'origine:

(a) Nous n'avons pas tenu compte, dans la représentation des génotypes, des 20% de crossing over survenus pendant la phase G1 entre thr3 et arg6. Il faut remarquer à ce propos qu'il n'y a pas eu de crossing over entre arg6 et trp2 dans les 124 clônes his$^+$ analysés (ou peut-être un en phase G2).

Divers mécanismes, tant conversion que crossing over, peuvent rendre compte de ce phénomène. Le travail de Wildenberg (1970) donne des informations sur l'importance relative des différents mécanismes.

Dans le tableau 4, nous avons résumé les différents évènements ayant mis en jeu le locus thr3. Nous nous sommes intéressés à ce locus placé entre le centromère et his1 car il ne doit pas être affecté par les recombinaisons survenues dans le gène his1. Il faut tout d'abord remarquer que la formation d'un clône auxotrophe est le plus souvent la conséquence d'une conversion (18 cas sur 20). Mais le point le plus important est la fréquence élevée de 4+:4- aberrant ($4+:4-^{p}$ donnant une ségrégation post méïotique dans le cas des organismes à octades). Dans cette expérience, nous ne décelons que la moitié des $4+:4-^{p}$. En effet, ceux qui n'auront pas conduit à la formation d'un clône thr3/thr3 seront interprétés comme un crossing over pendant la phase G2 entre thr3 et arg6. La fréquence des $4+:4-^{p}$, corrigée pour tenir compte de ce biais est donc de 8/29 si on la rapporte à l'ensemble des conversions. Cette fréquence n'est pas directement comparable à celle des $4+:4-^{p}$ aux sites his1.1 et his1.315. En effet, pour ces deux sites, nous ne pouvons observé que les conversions 6+:2-, 5+:3- et $4+:4-^{p}$, les ségrégations 6-:2+ et 5-:3+ étant contresélectionnées, puisque nous n'étudions que des recombinaisons ayant provoqué un phénotype his^{+}. Il faut aussi noter que pour les sites his1.1 et his1.315, tous les $4+:4-^{p}$ sont visibles, puisque le gène his1 est encadré de deux marqueurs. Nous devons donc comparer les valeurs des rapports $\frac{2\ (4+:4-^{p})}{(6+:2-)\ +\ (5+:3-)}$ pour thr3, et $\frac{(4+:4-^{p})}{(6+:2-)\ +\ (5+:3-)}$ pour his1.1 et his1.315. Ces rapports sont égaux à 8/7 pour thr3, 2/78 pour his1.315 et 3/49 pour his1.1. Il est clair que ce type de ségrégation n'a pas du tout la même probabilité dans un "croisement monofactoriel" (thr3 x +) que dans un"croisement bifactoriel (his1.315 x his1.1).

Le plus simple pour interpréter ces résultats est d'attribuer la forte

fréquence des 4+:4-P au locus thr3 à la nature de l'allèle thr3 utilisé. Il est cependant possible que nous n'ayons pas affaire ici à un artefact. Ceci voudrait alors dire que le mécanisme de la recombinaison n'est pas le même dans les "croisements monofactoriels" et dans les "croisements bifactoriels". Nous discuterons dans le paragraphe consacré à la recombinaison induite par les U.V. de quelques faits qui laissent soupçonner de l'existence de ces deux mécanismes de recombinaison. Ces résultats peuvent aussi être rapprochés des différences que l'on observe dans les spectres de conversion pour un allèle donné suivant les croisements dans lesquels il est engagé (Paszewski et Prazmo 1969).

Recombinaison mitotique induite par les rayons X,résumé.

Un mécanisme commun est probablement responsable de la recombinaison mitotique spontanée et de la recombinaison mitotique induite par les rayons X. Les caractéristiques des cartes fines sont en faveur d'un modèle de recombinaison du type ADN hybride. On peut estimer la longueur de l'ADN excisé (x) à 75 nucléotides et celle de l'ADN hybride (h) à 600 nucléotides.

Bien que la conversion soit le phénomène le plus courant, il existe aussi des crossing over au cours de la recombinaison mitotique induite par les rayons X.

4. RECOMBINAISON MITOTIQUE INDUITE PAR LES U.V.

Recombinaison intragénique.

Bien que les U.V. soient le mode d'induction de la recombinaison mitotique le plus anciennement utilisé (James 1955), peu de choses sont connues sur la recombinaison intragénique, faute de recherches suffisan-

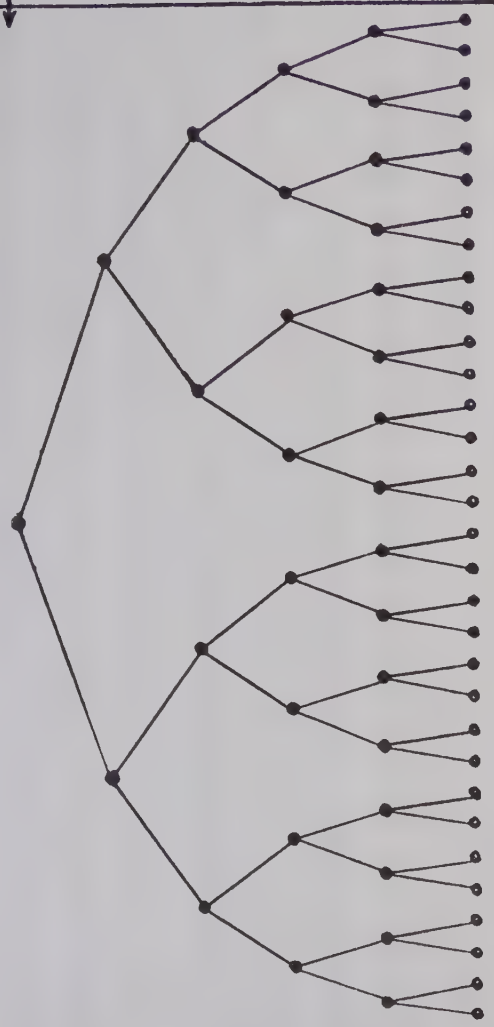
tes . En effet, le seul travail,publié, pour déterminer le génotype des cellules ayant subi une recombinaison intragénique est celui de Esposito R. (1968). Elle a analysé 37 clônes tyr^{+}ayant pour origine une recombinaison entre tyr1.1 et tyr1.2. Elle a trouvé 25 clônes de génotype tyr1.1/+ et 12 clônes de génotype tyr1.2/+. Il est très regrettable que l'échantillon étudié soit trop petit pour que l'on puisse obtenir une certitude quant à l'existence de doubles conversions au cours de la recombinaison intragénique induite par les U.V. D'autre part, comme la relation fréquence des prototrophes-dose d'U.V. n'est pas linéaire (Manney et Mortimer 1964), il n'a jamais été établi de carte fine par recombinaison induite par les U.V. Ceci nous prive donc de toute information sur la relation entre la fréquence des prototrophes et la distance physique.

Phase du cycle pendant laquelle se produit la recombinaison.

Häffner (1966) a étudié le phénomène qui conduit à l'homozygotie des gènes qui étaient à l'état hétérozygote dans le diploïde d'origine, et auquel on donne le nom de "recombinaison intergénique". Pour cela, il a irradié par les U.V. une population cellulaire homogène obtenue en sélectionnant, par centrifugation différentielle, les cellules non bourgeonnées d'une culture en phase stationnaire (cette technique étant semblable à celle de Wildenberg 1970, il est très probable que Häffner irradie des cellules en phase G1 -cf chapitre VI). Il fait l'arbre généalogique des cellules irradiées pendant 5 générations et il détermine le phénotype des 32 cellules ainsi obtenues. Il ne peut malheureusement pas déterminer leur génotype car la sporulation est très mauvaise après irradiation.

Le tableau 5 représente schématiquement les 6 généalogies, sur les 27 étudiées, où il est apparu des cellules auxotrophes. Dans aucun cas, nous ne pouvons affirmer que la cellule irradiée, qui était hétérozygote

TABLEAU 5.



Cellule irradiée	c6 (lysine)	c8 (lysine)	a2 (histidine)	b11 (uracile)	d4 (adénine)	d10 (leucine)
	−	−	−	+	+	x
	−	−	−	+	+	x
	−	−	−	+	+	x
	−	−	−	+	x	x
	−	−	x	+	+	+
	−	−	x	+	+	+
	−	−	x	+	+	+
	−	−	x	+	+	x
	−	x	+	+	+	−
	−	x	+	+	+	−
	−	x	+	+	+	−
	−	x	+	+	+	−
	x	x	+	+	+	+
	x	x	+	+	+	+
	x	−	+	+	+	+
	x	−	+	+	+	+
	+	−	+	−	x	+
	+	−	+	−	−	x
	+	−	+	−	+	+
	+	−	+	+	+	+
	x	−	+	+	x	+
	x	−	+	+	+	+
	−	−	+	+	+	+
	−	−	+	+	+	+
	+	x	−	−	x	−
	+	x	−	−	+	−
	+	x	−	+	−	−
	+	x	−	+	x	−
	+	x	−	+	x	−
	+	x	−	+	−	−
	+	x	−	+	−	−
	+	x	−	+	−	−

TABLEAU 5.

Représentation schématique de la généalogie de 6 cellules ayant été irradiées par les U.V. ($9{,}1\ 10^4$ erg cm^{-2}) (Häffner 1966). Chaque colonne correspond à la généalogie d'une de ces 6 cellules. Le génotype n'a pu être établi à cause de la mauvaise sporulation du diploïde utilisé.

(+) phénotype prototrophe

(-) phénotype auxotrophe (le besoin est indiqué en haut de chaque colonne.)

(x) cette cellule n'existe pas, à la suite de la létalité de ses ascendants ou bien cette cellule n'a pas donné de descendants. Dans les deux cas, on ignore son phénotype.

Le génotype du diploïde original est:

$$\frac{a}{\alpha}\ \frac{ade1}{+}\ \frac{trp1}{+}\ \frac{leu1}{+}\ \frac{lys2}{+}\ \frac{ura3}{+}\ \frac{arg4}{+}\ \frac{his4}{+}\ \frac{his2}{+}\ \frac{lys1}{+}$$

a donné naissance à une descendance homogène et homozygote, ce qui serait caractéristique d'une conversion survenue au cours de la phase G1. La seule généalogie qui donne une descendance homogène auxotrophe est c8. Elle est malheureusement incomplète à la suite de la mort d'une des 4 cellules de la génération 2. Nous ne pouvons donc rien conclure quant au moment où se fait la recombinaison mitotique induite par les U.V.

Un aspect surprenant des résultats de Häffner (1966) est qu'ils montrent des ségrégations tardives dans la descendance de la cellule irradiée. Si toutes les recombinaisons se produisaient dans la cellule irradiée et si on admet que chaque chromatide n'est formée que d'un seul brin d'ADN, les génotypes devraient être stables dès la deuxième génération. Or on observe que plusieurs évènements se sont succédés au cours des générations (c6, b11, d4, d10) et on observe même une ségrégation au cours de la 5e génération (b11).

Nous discuterons de ces phénomènes dans le sous chapitre consacré à l'appariement d'échange, mais on peut remarquer tout de suite que les conditions expérimentales sont très particulières dans ce travail. En effet, afin d'obtenir une très forte fréquence d'apparition de secteurs auxotrophes, Häffner a utilisé des doses d'U.V. importantes ($9{,}1\ 10^{4}$ erg cm^{-2}) et dans ces cas, la survie est très faible (inférieure à 0,5%). Il se peut donc que certains des phénomènes décrits ici ne soient pas généraux.

Nous ignorons donc si la recombinaison mitotique induite par les U.V. peut se produire pendant la phase G1.

Par contre, et ceci est différent, la phase du cycle qui est sensible à l'action des U.V. est connue, bien que les résultats obtenus varient suivant les techniques. Esposito R. (1968) en synchronisant ses cellules par une carence préalable trouve que le maximum d'efficacité des U.V. (et des rayons X) coïncide avec le début de la phase S. Parry et Cox (1968) eux trouvent que ce maximum (pour les U.V.,ils n'ont pas étudié l'action des rayons X) a lieu en fin de phase S en utilisant des cellules synchrones obtenues par centrifugation en gradient de saccharose. Ils

arrivent même à distinguer un temps pendant lequel se fait l'induction de la recombinaison intergénique (milieu de la phase S) et un temps pendant lequel se fait l'induction de la recombinaison intragénique (fin de la phase S).

Les expériences de Parry et Cox(1968) sont probablement moins biaisées par la technique de synchronisation utilisée que celles de Esposito R. (1968); la centrifugation en gradient de saccharose pendant un temps court (500g, 6 minutes) ne devant pas perturber les cellules autant que des séries répétées de carence.

Recombinaison intragénique et "intergénique".

Parry et Cox (1968) arrivent à séparer un stade au cours du cycle cellulaire où les U.V. induisent surtout des recombinaisons intragénique mises en évidence par la sélection de recombinés prototrophes de deux allèles, et un stade où les U.V. induisent des recombinaisons "intergéniques", mises en évidence par l'apparition de secteurs auxotrophes dans des colonies de cellules hétérozygotes. Il se peut que l'emplacement de ces maxima soit un artefact et on peut imaginer, à la limite, qu'ils sont confondus dans une population non traitée. Il n'en reste pas moins que le fait que ces maxima aient pu être séparés prouve l'existence de deux mécanismes de recombinaison, l'un responsable de la recombinaison intragénique et l'autre de la recombinaison "intergénique".

Ceci est à rapprocher des expériences de Roman et Jacob (1958). Ces auteurs ont utilisé une souche de génotype

$$\bullet\!\!-\!\!-\!\!-

non affecté par les recombinaisons survenues au locus isol, nous voyons que la fréquence des clônes isol$^+$ auxotrophes pour l'histidine passe de 43/360 au cours de la recombinaison spontanée à 5/360 au cours de la recombinaison induite par les U.V.

Nous savons que l'homozygotie est le plus souvent due à une conversion, tant au cours de la recombinaison spontanée (chapitre VI) qu'au cours de la recombinaison induite par les rayons X (tableau 4 de ce sous chapitre) Nous savons aussi que la recombinaison intragénique induite par les U.V. est essentiellement non réciproque (Esposito 1968). Il faut donc admettre, à la suite de l'expérience de Roman et Jacob, que les U.V. n'induisent pas de la même façon les conversions qui conduisent à des recombinaisons intragéniques (ce que nous pouvons appeler des "croisements bifactoriels") et celles qui conduisent à des recombinaisons "intergéniques ("croisements monofactoriels"). Nous avions déjà remarqué, au cours de l'étude de la recombinaison mitotique induite par les rayons X que, dans les "croisements monofactoriels", il existe une fréquence très élevée de ségrégation 4+:4-^{p} (4+:4- aberrant donnant une ségrégation post-méïotique chez les organismes à octades). Cette différence qualitative entre recombinaison intragénique et recombinaison"intergénique" est donc confirmée par l'étude de la recombinaison induite par les U.V.

Recombinaison mitotique induite par les U.V. résumé.

Ce type de recombinaison est très mal caractérisé génétiquement, ce qui fait que ses rapports avec la recombinaison mitotique spontanée, ou avec la recombinaison méïotique ne sont pas clairs.

Cependant, son étude a permis de montrer une différence qualitative entre les conversions qui se produisent au cours de la recombinaison intragénique quand il y a deux sites mutés en position trans et les conversions qui se produisent quand on a un allèle muté en face d'un allèle sauvage ("recombinaison intergénique").

5. RECOMBINAISON MITOTIQUE INDUITE PAR DES PRODUITS CHIMIQUES.

De nombreux agents sont connus pour induire la recombinaison mitotique. Le plus souvent, leur action génétique a été trop peu caractérisée pour qu'ils puissent nous apporter des informations supplémentaires sur la pluralité des mécanismes de recombinaison chez Saccharomyces cerevisiae.

Il faut toutefois signaler le cas du méthyl-méthane sulfonate (MMS), qui a été utilisé pour faire une carte fine du gène hisl, qui peut être comparée à la carte établie par recombinaison induite par les rayons X (Snow et Korch 1970). Pour ces deux cartes, la relation entre la fréquence de recombinaison et la distance physique a été établie en prenant l'ensemble des sites 3 par 3 et en calculant à chaque fois le rapport de la fréquence de recombinaison entre les sites a et c (f ac) sur la somme des fréquences de recombinaison entre a et b et entre b et c (f ab et f bc). Un rapport $\frac{f\ ac}{f\ ab + f\ bc}$ supérieur à 1 indiquera une expansion de la carte et un rapport $\frac{f\ ac}{f\ ab + f\ bc}$ inférieur à 1 une contraction de la carte. Dans le cas de la recombinaison induite par les rayons X, un échantillon de 135 triades donne une valeur moyenne de 0,998 à ce rapport. La distribution varie entre 0,101 et 1,74 avec un mode et une médiane de 1,0. Dans le cas de la recombinaison induite par le MMS, pour un échantillon de 66 triades, les auteurs ont trouvé une moyenne de 0,883, la distribution varie entre 0,252 et 1,71 et le mode et la médiane sont confondus à 0,92. Il semble donc qu'il y ait une certaine contraction de la carte établie à l'aide de l'induction par le MMS. Malheureusement, faute de renseignements sur les distances entre les sites utilisés pour ces rapports, nous ne pouvons tirer de conclusions de cette faible contraction de la carte. Il faut se rappeler qu'une telle contraction est prédite par le modèle de Fincham et Holliday (1970), selon lequel la recombinaison nécessite la formation d'un

TABLEAU 6.

Stade du cycle cellulaire	Longueur du fragment d'ADN excisé (a)	Longueur du fragment d'ADN hybride (a)
Méïose	> 700	> 700
Phase végétative	75	600

Grandeurs caractéristiques de la recombinaison intragénique à différents stades du cycle cellulaire.

Ces valeurs sont calculées à partir des résultats d'Esposito (1968).

(a) La longueur est exprimée en nucléotides.

ADN hybride , si la distance entre les sites est comprise entre la longueur de l'ADN hybride et la longueur de l'ADN excisé au cours du mécanisme de réparation et si il n'y a pas de crossing over (chapitre VI).

En première analyse, donc, la recombinaison induite par le MMS présente les mêmes caractéristiques que la recombinaison mitotique spontanée.

6. PLURALITE DES MECANISMES DE RECOMBINAISON CHEZ S.CEREVISIAE.

La diversité des mécanismes de recombinaison est apparue à deux niveaux au cours de notre étude de la recombinaison chez Saccharomyces cerevisiae. Soit pour un même type de recombinaison à différents points du cycle cellulaire (par exemple la recombinaison intragénique au cours de la méïose et au cours de la phase végétative). Soit pour différents types de recombinaison à un point donné du cycle cellulaire (recombinaison intragénique et intergénique pendant la phase végétative).

La recombinaison intragénique.

Il existe une unité profonde dans les différents mécanismes de recombinaison intragénique de Saccharomyces cerevisiae. Cette unité ressort du fait que tous les résultats expérimentaux s'intègrent dans un modèle unique, celui de Fincham et Holliday (1970). La recombinaison intragénique semble donc nécessiter la formation d'ADN hybride, la correction des mauvais appariements de base sur cet ADN hybride se faisant par excision d'un fragment d'ADN.

Ceci étant posé, il faut cependant séparer la recombinaison intragénique méïotique et celle qui a lieu pendant la phase végétative. Suivant la phase du cycle cellulaire, en effet, les longueurs de l'ADN hybride et de l'ADN excisé varient (tableau 6). Le fait que la longueur du fragment excisé soit différente suivant la phase traduit, nous sem-

ble-t-il, une différence au niveau des enzymes responsables de la correction puisque de toutes façons cette excision se produit dans une zone d'ADN hybride, dont la structure ne doit pas varier au cours du cycle cellulaire. Les différences au niveau de la longueur de l'ADN hybride peuvent être attribuées à des variations de la spiralisation des chromosomes puisque d'un point de vue thermodynamique, rien ne limite l'extension d'une structure d'ADN hybride (Sobell 1972).

Dans l'état actuel de nos connaissances, il semble que le mécanisme de la recombinaison intragénique au cours de la phase végétative soit indépendant du processus utilisé pour induire cette recombinaison (rayons X, agent chimique, recombinaison spontanée).

Il est possible que la recombinaison intragénique méïotique soit un phénomène complexe mettant en jeu deux cycles de recombinaison, mais ce point n'est pas établi de façon définitive.

Conversion dans les croisements "mono" et "bifactoriels".

Deux séries d'expériences font suspecter de l'existence de deux mécanismes de conversion actifs tous deux pendant la phase végétative. Un de ces mécanismes serait efficace au cours des recombinaisons entre deux allèles mutants (recombinaison intragénique ou croisements "bifactoriels") tandis que l'autre agirait dans les cas où un gène est hétérozygote (croisements "monofactoriels" qui donnent, par abus de langage les"recombinaisons intergéniques" chez S.cerevisiae).

Nos arguments en faveur de cette distinction sont les suivants. Dans les croisements monofactoriels, la conversion se caractérise par une fréquence très élevée des $4+:4-^{p}$ (4+:4- aberrant donnant une ségrégation post-méïotique dans les organismes à octades). Les U.V. induisent de façons différentes les conversions dans les croisements monofactoriels et dans les croisements bifactoriels.

Malgré les arguments supplémentaires que nous apportera l'étude de la

recombinaison mitotique chez Ustilago maydis

la dualité des mécanismes de conversion n'est pas définitivement établie.

Le problème du crossing over.

Il est clair qu'au cours de la recombinaison mitotique, la fréquence des crossing over est très faible, et que les conversions ne sont pas associées, une fois sur deux, à des crossing over. Il n'y a alors aucune raison de penser que ces deux phénomènes sont dus à un évènement unique. Il persiste malgré tout une certaine interférence entre ces deux types de recombinaison.

Au cours de la méïose, la situation n'est pas claire chez S. cerevisiae. Nous verrons dans le paragraphe consacré à Ustilago maydis qu'il est aussi possible de séparer conversion et crossing over au cours de la méïose.

AUTRES ORGANISMES.

Chez aucun autre organisme, l'existence de plusieurs mécanismes de recombinaison n'est établi avec autant de certitude que chez Saccharomyces cerevisiae. Mais il y a toujours des différences, peut-être significatives; entre recombinaison mitotique et recombinaison méïotique. Au cours de cette partie, nous nous attacherons surtout à mettre en évidence ces différences.

1. USTILAGO MAYDIS.

Recombinaison mitotique induite par les U.V.

Chez ce champignon, le taux de recombinaison mitotique spontanée est très faible, ce qui fait que la plupart des expériences utilisent l'induction de la recombinaison par les U.V.

La recombinaison intragénique mitotique induite par les U.V. a été étudiée au locus nitrate réductase (nar) (Holliday 1966). Elle est essentiellement non réciproque. Malheureusement, trop peu de recombinés ont été analysés pour que l'on puisse savoir s'il existe des doubles conversions (34 clônes nar^+ analysés en additionnant les résultats de trois croisements différents). Cette étude a permis de construire une carte du gène nar. Pour estimer la linéarité de la relation fréquence de recombinaison-distance physique, on calcule le rapport de la fréquence de recombinaison ac sur la somme des fréquences de recombinaison ab et bc. Une valeur supérieure à 1 indique une expansion de la carte et une valeur inférieure à 1 une contraction. Dans le cas du gène nar, ce rapport peut être calculé pour 6 triades d'allèles. On obtient les valeurs suivantes: 1,8 ; 1,35 ; 0,71 ; 0,66 ; 0,39 ; 0,63 . En première approximation la carte est linéaire. L'échantillon testé est en effet trop petit pour qu'on puisse affirmer que la contraction de la carte observée entre les sites extrêmes est significative.

Afin d'étudier la relation qui existe entre la recombinaison intragénique induite par les U.V. et le crossing over, Holliday (1966) a utilisé le diploïde suivant $\frac{inos2 \quad nic}{inos3 \quad +}$ (La mutation inos entraîne l'auxotrophie pour l'inositol et nic le besoin en acide nicotinique). La fréquence d'homozygotie au locus nic varie peu en fonction des recombinaisons intragéniques qui se sont produites au locus inos (nic/nic parmi les $inos^+$ 2,3%, parmi les $inos^-$ 1%).La conversion n'est donc pas associée au crossing over.

On retrouve dans la recombinaison mitotique induite par les U.V. chez Ustilago maydis les mêmes caractéristiques que chez Saccharomyces cerevisiae. En plus, il semble que la recombinaison intragénique mitotique induite par les U.V. soit identique à la recombinaison spontanée (carte linéaire dans les deux cas).

Relation crossing over-conversion.

Une découverte récente fait d'Ustilago maydis un exemple de choix pour illustrer notre thèse d'une origine indépendante pour le crossing over et pour la conversion. Dans les diploïdes homozygotes pour les mutants nucl et nuc2, ce qui entraîne une déficience en exo et en endonucléase, il n'y a plus de recombinaison intragénique, ni au cours de la mitose, ni au cours de la méïose, alors que les crossing over ne sont pas affectés. (Badman 1972).

Chez Ustilago maydis, toutes les relations logiques entre conversion et crossing over existent: conversion associée au crossing over (recombinaison méïotique), conversion sans crossing over (recombinaison mitotique), crossing over sans conversion (souches nucl et nuc2). A notre avis, ceci oblige à revoir le problème des relations crossing over conversion sous un autre angle. Ce qu'il faut étudier maintenant, c'est le mécanisme moléculaire du crossing over et chercher là la raison de cette interférence qui existe, malgré tout, entre ces deux phénomènes d'origine distincte.

2. ASPERGILLUS NIDULANS.

La recombinaison mitotique a été particulièrement étudiée chez Aspergillus nidulans. (Dans ce paragraphe, nous utiliserons la nomenclature de Pontecorvo et Käfer, 1958).

Phase pendant laquelle se produit la recombinaison.

Le schéma type d'une expérience pour étudier la recombinaison mitotique est le suivant. On part d'une colonie de génotype $\frac{a+}{+b}$, les allèles a et b sont récessifs et entraînent l'auxotrophie pour un produit quelconque. On étale les conidies qui se sont formées sur cette colonie sur du milieu minimum. Quand il se produit une recombinaison intragénique dans la conidie, celle-ci donne naissance à une colonie de phénotype (+). Pour déterminer le génotype de cette colonie, on en prend des conidies qu'on haploïdise en les étalant sur un milieu approprié. Il suffit alors d'analyser les colonies haploïdes ainsi obtenues. Cette technique est équivalente à l'analyse des spores en vrac des clônes recombinés chez Saccharomyces cerevisiae. Il n'est donc pas possible de déterminer de façon routinière si la colonie recombinée de phénotype (+) a un génotype mixte. Si la colonie est formée de noyaux de génotype ++/a+, on trouvera après haploïdisation 1/2 de colonies ++ et 1/2 de colonies a+. Par contre, si la colonie est formée de deux types de noyaux certains de génotype ++/a+ et d'autres de génotype ++/++, l'analyse donnera 3/4 de colonies haploïdes ++ et 1/4 de colonies a+. Comme on ne détermine que le génotype d'un petit nombre de colonies haploïdes, il est pratiquement impossible de distinguer les deux cas.

On ne peut donc pas déterminer si un recombiné de phénotype (+) s'est formé à la suite d'une conversion 6+:2- ou d'une conversion 5+:3-.

Comme de plus il n'est pas possible d'établir de généalogie (car c'est un champignon filamenteux), nous ne pouvons pas savoir en utilisant une

TABLEAU 7.

Génotype	Effectif observé	Effectif théorique
9 + 2 + + 15 + 18	Génotype original	
+ + + + + 15 + 18	16	6,3
+ + + + + + + 18	5	2,36
+ + 2 + + 15 + +	3	12
+ + 2 + + + + +	2	4,45
9 + + + + + + 18	14	26,2
9 + + + + + + +	2	1,47
9 + 2 + + + + +	61	50
9 + 2 18 + + + +	1	1,47
9 + + + + + 2 18	1	

Génotype des 105 clônes ad^+ $paba^+$ issus d'une recombinaison au locus ad9 (allèles 9 et 15) et d'une recombinaison au locus pabal (allèles 2 et 18). Ce tableau est établi d'après les résultats de Putrament (1967 b). Les effectifs théoriques des différentes catégories sont calculés en postulant que parmi les ad^+paba^+, les conversions aux deux loci sont indépendantes.

technique purement génétique si des recombinaisons se produisent pendant la phase G1.

Recombinaison intragénique.

Putrament (1967b) a étudié la recombinaison intragénique mitotique à l'aide du diploïde suivant:

$$\frac{\text{pro}\quad 9\quad +\quad 2\quad +\quad\quad y\quad +}{+\quad\quad +\ 15\ +\ 18\quad\quad +\ \text{bil}}$$

(20) (8) (16) (6)

(9 et 15 sont des allèles du gène ad9 distance 9,3+/10^5 spores et 2 et 18 sont des allèles de pabal distance 26+/10^5 spores. La distance 9-2 est de 0,5% de crossing over).

Au cours de la recombinaison mitotique spontanée, il se produit des conversions simultanées dans les loci ad9 et pabal. Le génotype de 105 de ces clônes ad+paba+ est résumé dans le tableau 7. Il existe une similitude frappante entre ces résultats et ceux que nous avons obtenu au cours de l'étude de la recombinaison mitotique chez Saccharomyces cerevisiae. Ici aussi, les conversions simultanées sont des doubles conversions Les enseignements supplémentaires apportés par l'étude de ce croisement à 4 facteurs sont: 1) L'ADN hybride peut s'étendre sur plus d'un gène. Il est en effet exclu que les ad+paba+ résultent de deux évènements indépendants (fréquence de prototrophes pour 10^6 conidies testées: ad+ 90, paba+ 25 ad+paba+ 1,36). 2) Nous avons calculé la distribution théorique dans l'hypothèse où, lorsqu'une conversion s'est produite sur une chromatide donnée au locus ad9, elle a autant de chance d'être associée à une conversion sur la même chromatide qu'à une conversion sur l'autre chromatide au locus pabal. Ceci revient à écrire que la fréquence de la catégorie $\frac{+\quad +\ +\quad +}{+\ 15\ +\ 18}$ est égale au produit de la fréquence de la conversion de 9 vers + parmi les ad+paba+ par la fréquence de la conversion de 2 vers + parmi les ad+paba+ (tableau 7). Le χ^2 donne une probabilité de 2% d'obtenir une distribution expérimentale plus mauvaise (χ^2= 13,35, degré de

liberté 5). En première approximation, les doubles conversions qui se produisent le long d'un ADN hybride peuvent être considérées comme indépendantes. Cependant, il faut remarquer que le biais dans la distribution expérimentale est systématique. Ce sont toujours les catégories où les deux conversions se produisent sur la même chromatide ($\frac{+\ +\ +\ +}{+\ 15\ +\ 18}$ et $\frac{9\ +\ 2\ +}{+\ +\ +\ +}$) qui sont en excès. Pour s'assurer que ce biais n'est pas dû aux allèles utilisés, il faudrait étudier de la même façon la recombinaison dans un diploïde $\frac{9\ \ +\ +\ 18}{+\ 15\ 2\ \ +}$. On devrait toujours observé un excès de recombinés $\frac{ad+paba+}{ad-paba-}$. Admettons que ces résultats confirment que lorsqu'une conversion a eu lieu sur une chromatide cela augmente les chances pour la deuxième conversion de se produire sur la même chromatide. Ceci pourrait indiquer que l'ADN hybride ne se forme parfois que sur une des chromatides. Sur cet ADN hybride, les conversions au cours de la recombinaison mitotique continuent à être indépendantes, puisque dans le cas présent, le site intermédiaire n'est pas converti (cas de 15 pour le recombiné $\frac{+\ \ +\ +\ \ +}{+\ 15\ +\ 18}$ et de 2 pour le recombiné $\frac{9\ +\ 2\ +}{+\ +\ +\ +}$). Il est possible de faire une autre hypothèse qui rende compte de ces résultats, et dans laquelle on admet que l'ADN hybride se forme toujours sur les deux chromatides. Nous en discuterons au cours de l'exposé de notre modèle.

Ces conversions simultanées ont été recherchées au cours de la recombinaison méïotique (Putrament 1967b). Des impératifs techniques ont obligé l'auteur à utiliser un diploïde $\frac{17\ +\ 2\ +}{+\ 15\ +\ 18}$ (distance 17-15 1,4 prototrophe/10^5 spores). Elle n'a trouvé aucun ad+paba+ sur 1,15 10^8 spores testées.

L'existence de doubles conversions au locus ad9 (7cas) ou au locus pabal (2cas) montre que la taille de l'ADN excisé au cours de la conversion est petite par rapport à la distance entre les sites 9 et 15 ou 2 et 18, au cours de la recombinaison mitotique. Nous ne possèdons malheureusement aucune information sur la grandeur du fragment d'ADN excisé au

TABLEAU 8.

Evènement au locus pfp						16										24		Effectif
						3+:1-							4+:4-P			3+:1-		
Crossing over pfp-centromère:						0				1			0			0	1	
Evènement au locus ribol						Rien:	3+:1-	1+:3-	Rien:	3+:1-	1+:3-	4+:4-P				Rien:	Rien	
Génotype sulad20	ribol	pfp	anl	y	ad20													
-	-	r	+	+	-	+	+	+										16
	+																	
-	+	r	+	+	-		+			2x+								4
-	+	r	+	+	-								+					16
?	-	sr	-	-	+				+		+					+		21
?	+	r	-	-	+						+							2
	-																	
-	-	r	+	+	-			+									+	6
	-																	
-	-	r	+	+	-								+					13
	-	sr	-	-	+													
?	+	r	-	-	+				+									7
	-																	
+	+	r	+	+	-												+	0
?	+	r	-	-	+				+									perdu
			-															
?	-	r	+	-	+				+									1
	+																	

TABLEAU 8.

Interprétation des résultats de Morpugo et Volterra (1968).

Le crossing over s'est produit entre anl et le centromère. Le recombiné homozygote anl/anl est perdu dans cette expérience. Dans une autre expérience; où ce recombiné est sélectionné, il y en avait 3 sur 90 colonies pfp^+ sélectionnées.

Dans cette expérience, il est impossible de distinguer les ségrégations 6:2 et 5:3, aussi avons nous écrit 3:1; $4+:4-^p$ indique une ségrégation 4+:4- aberrante.

cours de la recombinaison méïotique. Faute de ce renseignement, nous ne pouvons pas trancher entre les deux hypothèses suivantes quant à la différence qui existe entre recombinaison mitotique et recombinaison méïotique. 1) L'ADN hybride est plus long au cours de la recombinaison mitotique qu'au cours de la recombinaison méïotique (hypothèse de Putrament). Dans cette hypothèse, la fréquence des ad+paba+ au cours de la méïose avec le diploide $\frac{17 \; + \; 2 \; +}{+ \; 15 \; + \; 18}$ est de $0{,}36 \; 10^{-8}$. 2) L'ADN hybride couvre les deux gènes, aussi bien au cours de la recombinaison mitotique qu'au cours de la recombinaison méiotique, mais, dans le dernier cas, la longueur du fragment d'ADN excisé est grande par rapport à la distance entre les sites. Si ce fragment d'ADN couvre simultanément 2 et 15, on voit qu'il est impossible d'obtenir un recombiné ad+paba+. On observe soit un recombiné $\frac{17 \; 15 \; + \; +}{+ \; 15 \; + \; 18}$ (paba+) soit un recombiné $\frac{17 \; + \; 2 \; +}{+ \; + \; 2 \; 18}$ (ad+) suivant le sens de la conversion. Dans ces conditions la fréquence des ad+paba+ au cours de la méïose est inférieure à $0{,}36 \; 10^{-8}$.

Cette dernière hypothèse nous semble la plus probable car elle est homogène avec ce que nous connaissons déjà de la recombinaison intragénique chez Saccharomyces cerevisiae.

D'autre part, Morpugo et Volterra (1968) ont étudié la recombinaison intragénique mitotique au locus pfp (les mutants pfp sont résistants à la parafluorophénylalanine et leur croissance est inhibée par un mélange de L 3 aminotyrosine et d'acide phénylanthranilique). Leurs resultats sont moins complets que ceux que nous venons d'analyser, mais ils apportent des informations complémentaires.

Ces auteurs utilisent un diploïde

$$\frac{\text{sulad20} \qquad \text{ribol} \; + \; 24 \qquad + \qquad\qquad + \; \text{ad20}}{+ \qquad\qquad + \; 16 \; + \qquad \text{anl} \qquad\quad y \; +}$$
$$(39) \qquad (0{,}2) \quad (19) \quad (24) \quad (42) \quad (0{,}1)$$

(16 et 24 sont deux allèles de pfp. La distance qui les sépare est inconnue).

Ils isolent les recombinés pfp+ en étalant les conidies sur du milieu minimum contenant de la L 3 aminotyrosine et de l'acide phénylanthranilique. Le phénotype de ces clônes recombinés est testé, puis on étale les conidies sur un milieu contenant de la parafluorophénylalanine. Ce produit haploïdise les cellules, mais seules les chromatides oui portent l'allèle pfp résistant (allèle muté) vont donner naissance à un clône dont on teste le phénotype. Comme nous l'avons déjà remarqué au début de ce paragraphe, une telle technique ne permet pas de mettre en évidence les clônes mixtes de façon systématique (l'existence de tels clônes a cependant été montrée par Morpugo et Volterra 1968). De plus, dans le cas présent, on ne connait en général que la composition génétique de la chromatide portant l'allèle résistant, sans même que la nature de cet allèle soit déterminée. L'imprécision de cette analyse rend difficile l'interprétation des résultats de Morpugo et Volterra. En effet, il n'est pas possible d'établir de façon certaine quels évènements sont à l'origine des clônes recombinés étudiés. Certaines hypothèses peuvent être rejetées car elles prédisent l'existence de génotypes qui n'ont pas été observés (c'est le cas, par exemple du crossing over intragénique ou du crossing over entre pfp et sulad20), d'autres car elles prédisent des rapports entre les fréquences des différents génotypes très différents de ceux observés (c'est le cas par exemple, d'une ségrégation 4+:4- aberrante de ribol associée à une conversion vers + de l'allèle 16). Ces considérations nous ont conduit à l'interprétation résumée dans le tableau 8. Nous discuterons plus loin des problèmes posés par le crossing over. Pour ce qui est de la recombinaison intragénique les résultats sont du même type que ceux obtenus par l'étude de la région ad9pabal. Les conversions au locus pfpsont le plus souvent associées à des conversions au locus ribol, ce qui peut signifier que l'ADN hybride couvre le plus souvent les deux gènes. Un résultat remarquable apporté par ce travail est l'existence d'une très forte corrélation entre les ségrégations 4+:4- aberrantes aux loci pfp et ribol. De plus, les recombinés ++ et 16 24 obtenus à la suite de cet évènement ont un phénotype nouveau, intermédiaire entre celui de la souche sau

vage de référence et celui des mutants 16 et 24 (Volterra et Morpugo 1969) Il n'existe pas d'hypothèse satisfaisante pour rendre compte de cette apparente non fidélité du mécanisme de recombinaison dans ce cas particulier.

Mécanismes conduisant à l'homozygotie.

Au cours de la recombinaison mitotique chez Aspergillus nidulans, il se produit des crossing over au stade 4 chromatides (Pontecorvo, Tarr Gloor et Forbes 1954). Le plus souvent, il ne se produit qu'un seul crossing over par noyau.

Dans l'expérience de Putrament (1967b), parmi les 105 clônes ad+paba+ dont elle a déterminé le génotype, 20 étaient $\frac{y+\ bil}{y+\ bil}$, 14 $\frac{y\ bil+}{y\ bil+}$ et 16 étaient recombinés entre paba et y les gènes y et bil restant hétérozygotes.C'est le type de distribution attendue si un crossing over s'est produit au stade 4 chromatides entre prol et y. En effet, si un crossing over a lieu au stade 4 chromatides, il peut conduire à 4 catégories de cellules diploïdes dont 3 auront un génotype différent du génotype original (les génotypes $\frac{prol\ y+\ bil}{+\ \ y+\ bil}$, $\frac{prol\ y\ bil+}{+\ \ y\ bil+}$ et $\frac{prol\ y\ \ +}{+\ \ +\ bil}$). Si les chromatides migrent au hasard, ces trois catégories de cellules ont la même probabilité et la somme de leurs effectifs est égale aux 3/4 de l'effectif total des recombinés. Nous observons 50 recombinés sur 105 ad+paba+ testés, on peut donc estimer qu'un crossing over se produisant entre prol et y au stade 4 chromatides est associé dans 62% des cas à une recombinaison intragénique dans la région ad9pabal.

Par contre, dans l'expérience de Morpugo et Volterra (1968), la fréquence des crossing over associés est beaucoup plus faible, de l'ordre de 25% et ceux-ci se produisent entre pfp et le centromère.

La relation entre crossing over et recombinaison intragénique mitotique semble plus complexe ici que chez la levure. Ceci est peut-être la conséquence de la très forte interférence positive qui existe au cours de la recombinaison mitotique chez Aspergillus nidulans et qui limite le nombre de crossing over à 1.

Un résultat très intéressant a été obtenu par Bandiera, Morpugo et Volterra (1970). Ces auteurs ont utilisé un diploïde

sulad20 + ribol pfp + anl / prol + pabal + ad20 y bil +
(39) (0,2) (19) (24) (18) (8) (16) (0,1) (6)

hétéroallèlique au locus pfp et un autre de même génotype, mais hétérozygote au locus pfp. Il est ainsi possible de comparer les clônes homozygotes obtenus par sélection directe (clônes pfp/pfp issus du diploïde */pfp) et ceux qui ont été tout d'abord sélectionnés comme ayant subi une recombinaison intragénique (diploïde 16/24). Les mécanismes qui ont entraînél'homozygotie diffèrent suivant le crible. Dans le premier cas, on observe presqu'exclusivement des crossing over (280 crossing over sur 285 clônes pfp/pfp analysés). Dans le deuxième cas, les résultats sont plus complexes. Nous avons vu précédemment que la recombinaison au locus pfp est associée dans 25% des cas à un crossing over entre pfp et le centromère et que l'homozygotie au locus ribol est le plus souvent la conséquence d'une conversion. La recombinaison intragénique au locus pfp est aussi associée à des recombinaisons sur l'autre bras du chromosome (31 colonies auxotrophes pour la proline sur 1530 colonies pfp+ testées et 33 colonies homozygotes au locus pabal sur 1350 colonies pfp+ testées. Aucune recombinaison dans les colonies qui sont restées pfp). 27 des colonies prol/prol sont issues d'une conversion et 3 d'une haploïdisation Par contre 32 des 33 colonies pabal/pabal ont pour origine un crossing over.

Cette expérience montre qu'il existe une interférence négative entre les conversions, même à de grandes distances (61 centimorgans). Nous avio déjà rencontré ce phénomène au cours de l'étude de la recombinaison mitotique spontanée chez Saccharomyces cerevisiae (chapitre VI). Une information supplémentaire apportée par Aspergillus nidulans est que cette régio d'interférence négative("d'appariement effectif" pour utiliser un autre terme) s'interrompt brutalement (Elle ne couvre pas pabal qui est à 8 centimorgans de prol), et qu'à l'extérieur de cette région, il se produit

des crossing over. Tout ceci est très remarquable et semble spécifique de la recombinaison mitotique. D'un point de vue formel, ces évènements sont très voisins de ceux qu'on observe au cours de la recombinaison intragénique. On hésite cependant à faire l'hypothèse d'un ADN hybride se formant sur de si grandes longueurs.

Une autre information apportée par l'expérience de Bandiera, Morpugo et Volterra (1970) est que le type de recombinaison observée dépend des techniques de sélection. Le fait qu'on ait soit des crossing over, soit des conversions, nous semble être un argument supplémentaire en faveur de l'existence de deux mécanismes distincts, un pour le crossing over, l'autre pour la conversion.

3. CONCLUSIONS.

L'étude de la recombinaison mitotique chez Ustilago maydis et chez Aspergillus nidulans nous a permis de retrouver les principales conclusions qui s'étaient dégagées de l'analyse de la recombinaison mitotique chez Saccharomyces cerevisiae. C'est-à-dire, la petite taille du fragment d'ADN excisé au cours de la recombinaison intragénique et l'existence de deux mécanismes de recombinaison, un pour le crossing over et l'autre pour la conversion.

CONCLUSION GENERALE. UN MODELE POUR LA RECOMBINAISON MITOTIQUE.

La grande homogénéité des phénomènes que nous avons observés chez Saccharomyces cerevisiae, Ustilago maydis et Aspergillus nidulans justifi que nous tentions de présenter un modèle qui rende compte de la recombinaison mitotique en général.

1. RECOMBINAISON INTRAGENIQUE.

Le modèle.

Pour se produire, la recombinaison intragénique nécessite la formation d'ADN hybride. Cet ADN hybride possède les caractéristiques suivante il s'étend sur les deux chromatides, il n'entraîne pas d'enjambement entre les chromatides. Tous les mécanismes qui conduisent à un tel état sont équivalents, d'un point de vue formel, aussi est-il inutile de s'attacher à un schéma particulier. L'établissement du mécanisme réel relève de l'étude de l'appariement d'échange, dont nous discuterons dans le sous chapitre suivant.

Pour rendre compte de la corrélation qui existe entre les corrections sur les deux chromatides, nous postulons l'existence d'une endonucléase à deux sites actifs, chacun attaquant un brin d'ADN de polarité opposée. Cette endonucléase court le long de l'ADN hybride et elle est active aux points où il y a rupture des liaisons hydrogène entre bases. Dans ces cas un des brins d'ADN est dégradé sur une longueur de 75 nucléotides. Cette attaque peut se faire sur les deux chromatides (ségrégation 6:2) ou sur une des deux si l'efficacité de l'endonucléase n'est pas totale (ségrégation 5:3). Les ségrégations $4+:4-^{p}$ sont dues soit à la non reconnaissance du mauvais appariement de bases sur les deux chromatides soit au fait qu'aucune molécule d'endonucléase n'est venue s'attacher à l'ADN hybride. Dans le dernier cas, on observe une corrélation très forte entre les

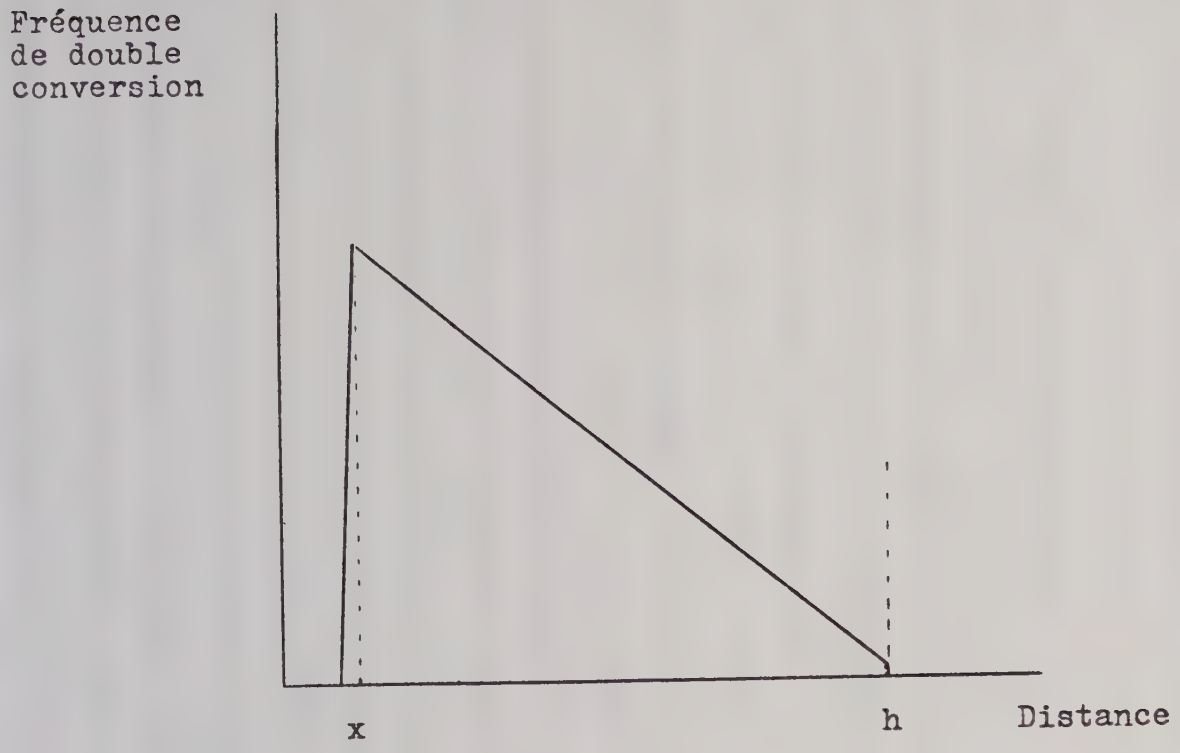


Figure 1.

Courbe théorique reliant la fréquence des doubles conversions à la distance entre les sites.

Pour les détails, voir le texte.

h= longueur de l'ADN hybride.

x= longueur du fragment d'ADN excisé au cours de la correction.

ségrégations $4+:4-^{p}$ à différents sites placés sur un même ADN hybride.

Les vérifications expérimentales.

Sur le plan biochimique, la meilleure preuve expérimentale en faveur de notre modèle serait l'isolement de cette endonucléase. Il faudrai la rechercher dans des cultures de Saccharomyces cerevisiae en phase végétative où on aurait induit l'aptitude à recombiner soit à l'aide d'une carence en histidine dans un diploïde ade3, soit à l'aide d'inducteur chimique (agents alkylants à faible dose, voir plus loin). Cette endonucléase doit être spécifique de ces conditions de culture et elle ne doit être active que sur de l'ADN monocaténaire ou sur de l'ADN bicaténaire renaturé, et inactive sur l'ADN bicaténaire natif.

Sur le plan génétique, on peut mesurer la longueur moyenne sur laquelle se déplace l'endonucléase en regardant comment varie la fréquence de doubles conversions en fonction de la distance qui sépare les deux sites (figure 1). Une fréquence nulle de double conversion obtenue en extrapolant la courbe vers les grandes distances correspond à une longueur d'ADN égale à la longueur moyenne sur laquelle court l'endonucléase. La fréquence de doubles conversions doit atteindre un maximum pour une longueur d'ADN non nulle, puis décroître quand la distance entre les sites diminue. Le point d'inflexion correspond à la longueur moyenne du fragment d'ADN excisé au cours de la réparation du mauvais appariement de bases.

Dans notre hypothèse, il doit exister une forte corrélation entre les ségrégations $4+:4-^{p}$ à des sites voisins. Les résultats de Morpugo et Volterra (1968) font suspecter de l'existence d'une telle corrélation. Ils mériteraient d'être confirmés. De même, les ségrégations 5:3 auraient une origine mixte, certaines provenant du fait que l'endonucléase n'est attachée que sur une des chromatides. Il est donc possible qu'il existe une corrélation entre les non corrections sur une même chromatide. Par contre, les ségrégations 6:2 à des sites suffisament distants devraient être indépendantes. Les résultats de Putrament (1967b) peuvent être

compris dans ce sens.

Ce modèle prédit un certain nombre de caractéristiques de la recombinaison intragénique mitotique. Elles peuvent être vérifiées expérimentalement, relativement facilement chez Saccharomyces cerevisiae. (Recombinaison dans des croisements tétrafactoriels au locus his4). Mais tous ces arguments formels n'auront pas autant de poids que la mise en évidence d'une endonucléase ayant les caractéristiques énoncées plus haut.

2. MECANISMES PROVOQUANT L'HOMOZYGOTIE.

Trop peu de choses sont connues pour qu'il soit raisonnable de proposer un modèle moléculaire pour ces phénomènes. A notre avis, les points suivants méritent une étude complémentaire.

Crossing over et conversion.

Ces deux phénomènes peuvent provoquer l'homozygotie, leur importance relative n'est pas bien déterminée. Les résultats de Bandiera, Morpugo et Volterra (1970) semblent indiquer que les cellules sont aptes au crossing over ou à la conversion. Dans ces conditions, les résultats obtenus dépendent de la technique de sélection utilisée. Il est donc indispensable de reprendre cette étude chez Saccharomyces cerevisiae en faisant la sélection primaire non pas pour une recombinaison intragénique mais pour la formation d'un homozygote (can^r, mutation récessive provoquant la résistance à la canavanine se prête particulièrement bien à cette sélection). Si on observe une différence entre les deux types d'expériences, ceci renforcera notre thèse selon laquelle crossing over et conversion sont dus à deux mécanismes différents.

Interférence négative entre les conversions.

Quand on utilise comme sélection primaire une recombinaison intra-

génique, on observe une forte interférence négative entre les conversion sur de grandes distances (quelques dizaines de centimorgans). Ce phénomène est très surprenant, la région où se produit cette interférence négative ayant des propriétés d'une zone où l'ADN serait hybride. Comme nous ne connaissons rien de l'aspect formel de ce phénomène, il est impossible de conclure. Il faut regarder si cette interférence joue aussi dans le cas de recombinaison intragénique à des loci voisins et il faut caractériser les conversions qui se produisent dans cette région (6:2; 5:3 et $4+:4-^{P}$) de la même façon que cela a été fait en recombinaison intragénique. Saccharomyces cerevisiae se prête particulièrement bien à cette étude grâce à la densité des marqueurs chromosomiques et à la grande longueur de certains chromosomes. Après une première description il serait intéressant de voir quel effet aurait une courte zone placée sous l'influence d'un "contrôle fin" de la recombinaison intercalée au milieu de cette interférence négative.

3. CONCLUSIONS.

L'étude de la recombinaison mitotique a permis des progrès importants dans le domaine de la recombinaison intragénique. Elle remet en question les relations crossing over conversion. Des phénomènes nouveaux d'interférence négative le long des chromosomes ont été découverts. Leur étude est indispensable.

L'APPARIEMENT D'ECHANGE.

Ce terme désigne un type particulier d'appariement des chromosomes au cours duquel se produisent les recombinaisons. Nous utiliseront ce terme plutôt que celui "d'appariement méïotique" qui est synonyme car il est plus général.

Très peu de choses sont connues sur ce phénomène. L'étude de la recombinaison mitotique a permis de mieux définir le problème et il est probable que cette technique sera encore fructueuse par la suite.

1. LES MODELES.

On considère au départ qu'il existe un appariement grossier des chromosomes homologues au niveau des chromomères (appariement somatique). La façon dont se forme cet appariement à partir de deux lots haploïdes de chromosomes n'est pas le sujet de notre travail.

L'étude de l'appariement d'échange a pour but d'établir par quel processus va se former de l'ADN hybride à partir des chaînes d'ADN de deux chromatides non soeurs.

Il existe fondamentalement deux types de mécanismes possibles. Nous les étudierons à travers les modèles de Stern et Hotta (1969) d'une part et de Sobell (1972) d'autre part.

Modèle de Stern et Hotta (1969).

Ce modèle repose sur les expériences de Stern et son équipe sur le métabolisme de l'ADN au cours de la méïose chez le lys.

Au cours de la phase S, une fraction particulière du génôme (séquences riches en G-C) n'est pas répliquée. Dans des cellules en phase végétative, cette réplication se produit peu de temps après la fin de la phase S. Par contre, au cours de la méïose, ces régions riches en G-C restent à l'état monocaténaire jusqu'au zygotène. Ceci permet l'appariement base par base des chaînes d'ADN des chromatides non soeurs et la forma-

tion d'un ADN hybride.

Tout agent inhibant la réplication de ces séquences riches en G-C dans des cellules en phase végétative crée donc des conditions préméïotiques et provoque l'appariement d'échange. Mais cet appariement ne peut se produire que dans des cellules en phase G2.

Pour rendre compte du fait que les recombinaisons mitotiques peuvent se produire pendant la phase G1, il faut supposer que l'agent inducteur a provoqué la formation de segments homologues d'ADN monocaténaire dans l'ensemble des chromosomes (on retrouve alors une situation semblable à une prophase méïotique). Comme nous le verrons par la suite, cette hypothèse est très invraisemblable.

Modèle de Sobell (1972).

Ce modèle est basé sur ce qu'on connait des interactions ADN-protéine.

On postule l'existence le long de la chaine d'ADN de séquences de bases ayant une symétrie quaternaire. De telles séquences sont obtenues par une duplication en tandem d'une séquence ayant une symétrie binaire. Quand une protéine spécifique, de nature tétramérique, se fixe sur une séquence de bases à symétrie quaternaire, l'ADN perd sa structure de type Watson-Crick pour prendre une structure de type Gierer (en trèfle). Dans ces conditions il apparaît deux boucles d'ADN partiellement monocaténaire. A partir de là, il est facile d'imaginer la formation d'un ADN hybride, puisque ces boucles d'ADN monocaténaire se forment simultanément dans des régions homologues des chromatides non soeurs.

Tout agent induisant la synthèse de cette protéine (la "recombinase") à quelque moment que ce soit au cours du cycle cellulaire provoque l'appariement d'échange.

Conclusion.

L'existence de recombinaisons mitotiques au cours de la phase G1 est un argument très fort en faveur d'un modèle d'appariement d'échange du type de celui de Sobell (1972).

2. INDUCTION DE L'APPARIEMENT D'ECHANGE.

Ce problème a été principalement étudié chez Saccharomyces cerevisia

Nature des agents inducteurs.

Nous considérons qu'un agent quelconque induit l'appariement d'échange quand il a pour action d'augmenter la fréquence des cellules aptes à recombiner dans une culture de cellules en phase végétative (cf chapitre III.). Le calcul de cette fréquence nécessite l'emploi d'une souche diploïde hétéroallèlique et repose sur la comparaison entre la fréquence des doubles recombinés et le produit des fréquences des simples recombinés. Ces informations font le plus souvent défaut dans les articles publiés jusqu'ici, ce qui fait que la liste des agents induisant de façon certaine l'appariement d'échange est très petite par rapport à la liste des agents augmentant la fréquence des recombinés pendant la phase végétative.

En plus de la carence en histidine dans des souches ade3, et des U.V. (cf chapitre III.), il faut signaler l'acide nitreux, la N.nitroso-N.méthylcaproamide, le 1 nitroso-imidazolidone 2 et la 1 méthyl-3 nitro-1 nitrosoguanidine (Zimmerman et Schwaier 1967).

Il est probable que la plupart des produits chimiques qui ont une action sur la recombinaison mitotique chez Saccharomyces cerevisiae (une liste très complète a été établi par Zimmerman 1971) provoque l'appariement d'échange car ils se rangent dans les mêmes groupes chimiques.

Le point le plus remarquable est que tous les produits chimiques capables d'induire la recombinaison mitotique sont mutagènes, ou tout au moins agissent sur le métabolisme de l'ADN (Zimmerman 1971).

Mutations agissant sur l'appariement d'échange.

La différence qui existe entre l'appariement d'échange et la recombinaison elle-même n'est bien établie qu'au cours de la recombinaison mitotique chez Saccharomyces cerevisiae. Nous serons donc obligés de limiter notre étude aux mutations de Saccharomyces cerevisiae affectant la recombinaison pendant la phase végétative.

En dehors d'ade3, toutes les mutations de ce type que l'on connaît sont plus ou moins fortement U.V. sensibles, et dans tous les cas, elles n'ont aucune action sur la recombinaison mitotique spontanée, mais présentent une augmentation de la sensibilité à l'action inductrice des U.V. (Snow 1968, Moustacchi 1969, Zakharov, Kozina et Fedorova 1970, Lemontt 1971, Mori et Nakai 1972).

Mode d'action.

Le problème est de savoir si l'induction de l'appariement d'échange est due à une action directe au niveau de l'ADN, ou non. Les informations que l'on possède sont de plusieurs types.

Comme nous l'avons montré dans le sous-chapitre précédent, les caractéristiques de la recombinaison mitotique ne dépendent pas de l'agent inducteur utilisé. C'est ce qui justifie d'ailleurs notre titre "La recombinaison mitotique spontanée". Ce qui est induit, c'est une étape antérieure: l'appariement d'échange.

On obtient une induction de la recombinaison mitotique avec des agents non mutagènes, tels que la carence en histidine dans une souche ade3, la mitomycine C (Holliday 1966).

On peut induire la recombinaison mitotique à l'aide de produits chimiqu

ou des U.V. sans affecter la survie des cellules.

La cinétique d'induction varie suivant l'agent utilisé. Elle peut-être à un coup (rayons X. Manney et Mortimer 1964; mitomycine C. Holliday 1964 à deux coups (méthylméthanesulfonate Snow et Korch 1970) ou complexe (U.V

Dans certains cas, il est possible de dissocier l'induction de la recombinaison de la recombinaison elle-même. Il en est ainsi dans l'expérience de Campbell (1972). Cet auteur irradie aux rayons X juste avant la copulation un des deux parents haploïdes. Dans ces conditions, il induit la recombinaison mitotique dans le zygote. Nous ne connaissons pas suffisament les détails expérimentaux pour savoir si l'action inductrice des rayons X est toujours sensible si l'irradiation est faite longtemps avant la copulation. (Un temps suffisant pour que fonctionnent les mécanismes de réparation, par exemple). D'autre part, nous avons déjà signalé l'expérience de Haeffner (1966) sur l'action des U.V. (sous chapitre précédent). Cet auteur a montré qu'une forte irradiation par les U.V. induit la recombinaison pendant plusieurs générations. Si on admet que chaque chromatide n'est formée que d'une molécule d'ADN, ce résultat ne peut se comprendre que si on admet que les U.V. n'ont pas induit la recombinaison par une action directe au niveau de l'ADN.

Le cas des U.V. doit être complexe, comme le montre leur cinétique d'induction en fonction de la dose (Holliday 1966, par exemple). Ils doivent agir sur l'appariement d'échange et aussi, quand la dose augmente, sur la recombinaison elle-même. Malheureusement, comme cette dernière n'a pas été étudiée, dans le cas de l'irradiation U.V., il est difficile de séparer les deux effets. L'étude de certains mutants U.V. sensibles (uvs) apporte quelques informations. Mori et Nakai (1972) ont montré que la sensibilité d'un diploïde $\frac{uvs1}{uvs1}\ \frac{leu1.18}{leu1.20}$, à l'action inductrice de la recombinaison des U.V., ne diffère pas de celle du diploïde $\frac{uvs1}{+}\ \frac{leu1.1}{leu1.2}$ quand il y a photoréactivation. Par contre, à l'obscurité le diploïde homozygote $\frac{uvs1}{uvs1}$ est beaucoup plus sensible que le diploïde $\frac{uvs1}{+}$.

La mutation uvs1 provoque probablement la non excision des dimères de thymine à l'obscurité. Il est tentant de rapprocher ces deux faits et de conclure, dans ce cas, que la fonction inductrice des U.V. est la conséquence de leur action sur l'ADN. L'étude d'autres mutants uvs nous conduirait plutôt à une conclusion inverse. Lemontt (1971) a étudié l'influence des mutations rev (mutations qui ont pour effet de réduire la mutabilité des génômes sous l'action des U.V.) sur la recombinaison. Si on compare le comportement des souches (rev) à celui de la souche sauvage, on observe qu'elles sont légèrement U.V. sensibles tant du point de vue de la survie que de celui de la recombinaison. Ces mutations provoquent donc une perte de l'effet mutagène, due à l'action directe des U.V. sur l'ADN et n'affectent pas l'induction de l'appariement d'échange. Ce résultat est en faveur d'une action indirecte des U.V., qui se comporteraient comme les autres agents inducteurs de l'appariement d'échange.

Les renseignements sont trop fragmentaires pour qu'on puisse tenter une synthèse sur le mode d'action des U.V. Il semble quand même que les expériences du type de celles de Haeffner (1966) montrent une action indirecte (par le cytoplasme?) des U.V. sur la recombinaison.

En dehors du cas des U.V., qui est encore mal décrit, il semble que tous les agents qui provoquent l'appariement d'échange ne le font pas par une action directe sur l'ADN, mais bien plutôt en agissant sur le métabolisme de l'ADN. Cette conclusion est provisoire et ce problème nécessite encore de nombreuses études pour que nous en ayons une vision claire.

BIBLIOGRAPHIE.

Badman Genet. Res. in press (1972).

Bandiera M., Morpugo G. et Volterra L. Barriers in intragenic mitotic crossing over. Mutation Res. 9 213-217 (1970).

Campbell D.A. Induction of mitotic gene conversion by X irradiation of haploid yeast. Genetics 71 s9 (1972).

Catcheside D.G. The control of genetic recombination in Neurospora crassa Replication and Recombination of Genetic Material. ed. W.J. Pe cock et R.D.Brock Canberra (1968).

Catcheside D.G. et Austin B. The control of allelic recombination at histidine loci in Neurospora crassa. Amer. J. Bot. 56 685-690 (1969).

Esposito M.S. X.ray and meiotic fine structure mapping of the adenine 8 locus in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 58 507-527 (1968).

Esposito R. Genetic recombination in synchronized cultures of Saccharomyces cerevisiae. Genetics 59 191-210 (1968).

Esposito R.E., Frink N., et Esposito M.S. Genetic recombination in conditional meiotic mutant of yeast. Genetics 68 s17-s18 (1971).

Fincham J.R.S. et Holliday R. An explanation of fine structure map expansion in terms of excision repair. Molec. Gen. Genetics 102 309-322 (1970).

Fogel S. et Hurst D.D. Meiotic gene conversion in yeast tetrad and the theory of recombination. Genetics 57 455-481 (1967).

Fogel S. et Mortimer R.K. Informational transfer in meiotic gene conversion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62 96-103 (1969).

Häffner K. Zum Mechanismus der Entstehung auxotropher Zellen in heterozygoten Saccharomyces. Stämmen nach U.V. und Röntgen Bestrahlung. Z. Vererbungsl. 98 82-90 (1966).

Helling R.B. The effect of arabinose specific enzyme synthesis on recombination in the arabinose genes of E.coli. Genetics 57 665-67 (1967).

Herman R.K. Effect of gene induction on frequency of intragenic recombination of chromosome and F. merogenetic in E.coli K12. Genetics 58 55-67 (1968).

Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5 282-304 (1964).

Holliday R. The induction of mitotic recombination by mitomycin C in Ustilago and Saccharomyces. Genetics 50 323-335 (1964).

Holliday R. Studies on mitotic gene conversion in Ustilago. Genet. Res. 8 323-337 (1966).

Hurst D., Fogel S. et Mortimer R.K. Conversion associated recombination in yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 101-105 (1972).

James A.P. Agenetic analysis of sectoring in ultraviolet induced variant colonies of yeast. Genetics 40 204-213 (1955).

Jones E.W. Fine structure analysis of the ade3 locus in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 70 233-250 (1972).

Kakar N.S. Allelic recombination and its relation to recombination of outside markers in yeast. Genetics 48 957-966 (1963).

Lemontt J.F. Pathways of ultraviolet mutability in Saccharomyces cerevisiae. 11. The effect of rev genes on recombination. Mutation Res. 13 319-326 (1971).

Luzzati M., Clavilier L. et Péré G. On the possibility of a specific repression at the genetic level. Proc. 11th Intern cong. Genet 1 40 (1963).

Luzzati M. Inhibition spécifique de la recombinaison intragénique. Thèse Faculté des Sciences d'Orsay(1965).

Manney T.R. et Mortimer R.K. Allelic mapping in yeast by X.ray induced mitotic reversion. Science 143 581-582 (1964).

Moens D.B. et Rapport E. Synaptic structure in the nuclei of sporulating yeast, Saccharomyces cerevisiae (Hansen). J. Cell Sci. 9 665-677 (1971).

Mori S. et Nakai S. Induction and repair of gene conversion in U.V. sen-

sitive mutants of yeast. Molec. Gen. Genetics 117 187-196 (197

Morpugo G. et Volterra L. The nature of mitotic intragenic recombination in Aspergillus nidulans. Genetics 58 529-541 (1968).

Moustacchi E. Cytoplasmic and nuclear genetic events induced by U.V. ligh in strains of Saccharomyces cerevisiae with different U.V. sensitivities. Mutation Res. 7 171-185 (1969).

Pany J.M. et Cox B.S. Mitotic recombination induced by ultraviolet light in synchronous cultures of yeast. Mutation Res. 5 373-384 (196

Parker J.H. et Sherman F. Fine structure mapping and mutational studies of gene controlling yeast cytochrome c. Genetics 62 9-22 (196

Paszewski A. et Prazmo W. The bearing of mutant and cross specificity on the pattern of intragenic recombination. Genet. Res. 14 33-43 (1969).

Paszewski A. Gene conversion: observations on the DNA hybrid models. Genet. Res. 15 55-64 (1970).

Pontecorvo G., Tarr Gloor E. et Forbes E. Analysis of mitotic recombination in Aspergillus nidulans. J. Genetics 52 226-237 (1954).

Pontecorvo G. et Käfer E. Genetic analysis based on mitotic recombination. Advan. Genet. 9 71-104 (1958).

Putrament A. On the mechanism of mitotic recombination in Aspergillus nidulans. 1. Intragenic recombination and DNA replication. Molec.Gen. Genetics 100 307-320 (1967a).

Putrament A. On the mechanism of mitotic recombination in Aspergillus nidulans. 11. Simultaneous recombination within two closely linked cistrons. Molec. Gen. Genetics 100 321-336 (1967b).

Roman H. et Jacob F. A comparison of spontaneous and ultraviolet induced allelic recombination with reference to the recombination of outside markers. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 23 155-160 (1958).

Sherman F. et Roman H. Evidence for two types of allelic recombination in yeast. Genetics 48 255-261 (1963).

Simchen G. et Stamberg J. Fine and coarse controls of genetic recombination. Nature 222 329-332 (1969a).

Simchen G. et Stamberg J. Genetic control of recombination in Schizophyllum commune: Specific and independent regulation of adjacent and non adjacent chromosomal regions. Heredity 24 379-381 (1969b)

Snow R. Recombination in ultraviolet sensitive strains of Saccharomyces cerevisiae. Mutation Res. 6 409-418 (1968).

Snow R. et Korch C.T. Alkylation induced gene conversion in yeast: use in fine structure mapping. Molec. Gen. Genetics 107 201-208 (1970).

Sobell H.M. Molecular mechanism for genetic recombination. Proc.Nat. Acad. Sci. USA 69 2483-2487 (1972).

Stahl F.W. One way to think about gene conversion. Genetics Suppl. 61 1-13 (1969).

Stern H. et Hotta Y. Biochemistry of meiosis in "Handbook of molecular cytology. A.Lima de Faria ed. 521-539 (1969)

Volterra L. et Morpugo G. Mitotic recombination and mutation. Mutation Res. 7 155-162 (1969).

Whitehouse H.L.K. et Hastings P.J. The analysis of genetic recombination on the polaron hybrid DNA model. Genet. Res. 6 27-92 (1965)

Whitehouse H.L.K. An operator model of crossing over. Nature 211 708-713 (1966).

Whitehouse H.L.K. The mechanism of genetic recombination. Biol. Rev. 45 265-315 (1970).

Wildenberg J. The relation of mitotic recombination to DNA replication in yeast pedigrees. Genetics 66 291-304 (1970).

Zakharov I.A., Kozina T.N. et Fedorova I.V. Effets de mutations vers la sensibilité au rayonnement ultraviolet chez la levure. Mutation Res. 9 31-39 (1970).

Zimmerman F.K. et Schwaier R. Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid, 1 methyl 3 nitro 1 nitrosoguanidine and other

alkylating agents in Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genetics 100 63-76 (1967).

Zimmerman F.K. Induction of mitotic gene conversion by mutagens. Mutation Res. 11 327-337 (1971).

Service de Reprographie
C.N.R.S.
Gif